



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS
DE METALES PRESENTES EN EL AGUA DE
BEBIDA DE LA POBLACIÓN DE
HUAUTLA, MORELOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MÓNICA LETICIA MARTÍNEZ PACHECO

TUTORA:

BIÓL. PATRICIA MUSSALI GALANTE

2008



**Facultad de Ciencias
UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Martínez
Pacheco
Mónica Leticia
25 98 29 12
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300212653

2. Datos del tutor

Biól.
Patricia
Mussali
Galante

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Isabel
García
Peláez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Efraín
Tovar
Sánchez

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Mario Agustín
Altamirano
Lozano

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de los efectos genotóxicos de metales presentes en el agua de bebida de la población de Huautla, Morelos
77 p.
2008

ESTA TESIS ESTÁ DEDICADA ...

A mis papás.

A Ju.

A mi hermana Iliana, mis tías Lupita y Sol, y a mis primos Caro y David.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, principalmente a la Dra. Fortoul por abrirme amablemente las puertas desde el primer día, por todas las oportunidades que me ha brindado, por sus consejos y observaciones durante la realización y revisión de este trabajo, y por la confianza que depositó en mí desde el principio, la cual es muy valiosa para mí, muchas gracias.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el otorgamiento de dos becas de licenciatura, como apoyo para la elaboración de esta tesis.

A la Biól. Patricia Mussali Galante, mi tutora y mi gran maestra. Gracias por todo lo que me has enseñado y brindado, por tu tiempo, tu paciencia y tus consejos invaluable, por las grandes oportunidades, por compartir conmigo este gran proyecto, por ser mi modelo a seguir y, sobre todo, por darme tu mano y amistad en todo momento, siempre serás mi maestra, la mejor y más importante, te quiero mucho Patty.

Al Dr. Efraín Tovar Sánchez, por haber hecho posible este trabajo, por ofrecerme su ayuda incondicional, aun sin conocerme, y por su buen humor ante todo. Efraín, gracias por tu entera disposición, por tu tiempo, por las visitas al campo, por tu asesoría, que, junto con la de Patty, es la mejor que pude tener, y por tus valiosos comentarios durante la elaboración y revisión de esta tesis.

A la Dra. M. Isabel García Peláez y al Dr. Mario A. Altamirano Lozano por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y por sus comentarios enriquecedores que lo complementaron, muchas gracias.

A Elgar Castillo Mendoza por su asistencia en la toma de muestras de sangre que se utilizaron para esta investigación y a Edgar Reyna Rosas por su ayuda durante la toma de muestras de agua y orina de los individuos muestreados, mil gracias.

A la Dra. Liliana Saldivar y la Q. Guadalupe Espejel, del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UNAM, por su colaboración en la medición de metales en las muestras obtenidas.

A la Dra. Luz María del Razo, del CINVESTAV, IPN por llevar a cabo el análisis de los metabolitos del arsénico en orina de los individuos muestreados.

Al Biól. Armando Zepeda, por su amabilidad, objetividad y paciencia durante la manipulación de las fotografías presentadas en esta tesis. Armando, agradezco infinitamente tus palabras, consejos y tu tiempo, significan mucho para mi.

A los donadores de Huautla y Ajuchitlán, Morelos, por su disposición, tiempo, paciencia y amabilidad, pues sin ellos este trabajo no hubiera podido realizarse, y por su colaboración durante la toma de muestras de agua de la mina. Agradezco de manera especial a la enfermera Nelly, por proporcionarnos el espacio adecuado para la toma de muestras de sangre. ¡ Muchas gracias a todos !.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Agradezco muy especialmente a mis papás por apoyarme e impulsarme en todo momento a ser alguien mejor, como persona y profesionalmente, y a quienes debo todo lo que soy. Gracias por sus valiosas lecciones de vida, por brindarme una familia y una educación de calidad, que son el mejor regalo que pudieron darme.

Mami, gracias por tus consejos, tus palabras de aliento y por recordarme constantemente mis cualidades, por darme tu cariño incondicional y la oportunidad de ser tu hija; eres la mujer mas maravillosa que conozco y siempre te admiraré, te adoro mamá.

Papi, muchas gracias por ser mi amigo, por aconsejarme siempre, por acompañarme a todos lados y por quererme tanto, por creer en mi todo el tiempo, por enseñarme que las cosas siempre resultan mejor si las hacemos bien desde el principio y que debemos trabajar mucho para lograrlo; sabes que te quiero muchísimo y que este trabajo lo hice por y para ti, gracias por todo, te adoro.

A Ju, mi mejor amigo, confidente y compañero incondicional, quien ha compartido conmigo cada una de las etapas importantes de mi vida y este logro. Ju, gracias por regalarme tu tiempo y paciencia, por escucharme y aconsejarme, por resaltar mis atributos y casi nunca mis defectos, por levantarme cuando me caigo y darme tu mano en los momentos de incertidumbre, gracias por tantos años de risas y cariño, por los errores que hemos cometido juntos y todo lo que también hemos aprendido, por crecer conmigo y demostrarme en todo momento lo mucho que crees en mi y en todo lo que hago, pero sobre todo, gracias por quererme como lo haces, por hacerme inmensamente feliz, por enseñarme tantas cosas de la vida y, por supuesto, por conectar el cañón en mis seminarios. Muchas gracias Ju, te admiro y te amo mucho.

A mi hermana Iliana y mis tías Lupita y Sol, por ser tan buenas amigas y mis segundas mamás, por estar disponibles siempre que las necesito, por sus palabras de aliento, paciencia y cariño, por ayudarme a creer que puedo realizar todo lo que me proponga y por apoyarme siempre, las quiero mucho. Agradezco también a mis primos Caro y David, a quienes quiero mucho, por regalarme tantos momentos divertidos y de risas interminables.

A mis amigos del alma Vladimir S., Vladimir E., Gaby y Mario, por tantos años de carcajadas, por brindarme su apoyo, confianza y amistad incondicionales, por dejarme compartir con ustedes este trabajo, por sus invaluable consejos y por sus valiosas opiniones; son las mejores personas que conozco y siempre serán importantes para mi. Los quiero mucho.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Carlos, Gumaro y Nelly, por tantos momentos agradables, por sus consejos personales y profesionales, los cuales son muy importantes para mi, y por todas esas pláticas llenas de cariño y buen humor. Mil gracias por todo, los quiero.

ÍNDICE

Pág.

RESUMEN.....	I
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 La minería	1
1.2 Contaminación por actividad minera	1
1.3 Contaminación de agua por actividad minera	2
1.4 El caso de Huautla, Morelos	5
1.5 El arsénico	6
1.6 El arsénico y efectos en la salud humana.....	7
1.7 El arsénico y genotoxicidad en humanos	9
1.8 Técnicas para evaluar genotoxicidad: Ensayo cometa	11
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17

5. METODOLOGÍA

5.1 Población testigo	18
5.2 Población expuesta	18
5.3 Consentimiento informado	19
5.4 Cuestionario	19
5.5 Criterios de inclusión	20
5.6 Toma de muestras de agua	20
5.7 Toma de muestras de sangre	21
5.8 Medición de metales en agua y sangre	21
5.9 Prueba de viabilidad celular	22
5.10 Electroforesis en gel de células únicas	22
5.11 Análisis estadístico.....	23

6. RESULTADOS

6.1 Concentración de metales en el agua de bebida.....	25
6.2 Concentración de metales en la sangre.....	27
6.3 Viabilidad celular.....	31
6.4 Genotoxicidad.....	31
6.5 Relación entre la concentración de As en sangre y el nivel de daño individua...	35
6.6 Efecto de la edad, consumo de alcohol y consumo de tabaco en la inducción de daño al ADN.....	35

7. DISCUSIÓN	
7.1 Contaminación del agua por arsénico en Huautla, Morelos.....	36
7.2 Concentración de arsénico en el agua de bebida de Huautla, Morelos.....	37
7.3 Concentración de As total en sangre periférica: Un biomarcador útil.....	38
7.4 Rompimientos de cadena sencilla inducidos por As en individuos expuestos en Huatla, Morelos.....	42
7.5 Influencia del estilo de vida en los resultados obtenidos con el ensayo cometa	47
7.6 Riesgos y Soluciones.....	49
8. CONCLUSIONES.....	52
9. APÉNDICE I	54
10. APÉNDICE II.....	57
11. LITERATURA CITADA.....	67

Martínez-Pacheco, M. L. 2008. Evaluación de los efectos genotóxicos de metales presentes en el agua de bebida en la población de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. 77 p.

RESUMEN

La contaminación de los cuerpos de agua por metales derivados de la industria minera es un problema muy importante de salud pública en el mundo. En México, existen varios sitios contaminados a lo largo de todo el país, cuyo riesgo es desconocido. Huautla, Morelos es una región minera por tradición, donde se estima que existen cerca de 780 mil toneladas de desechos tóxicos ricos en metales, aunado a esto, Morelos presenta suelos ricos en minerales con altos contenidos de arsénico y plomo, lo que podría estar contaminando el agua del lugar. Por lo que el objetivo del presente estudio fue medir las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn en el agua de bebida y en la sangre periférica de los individuos expuestos, así como evaluar los efectos genotóxicos de los mismos.

La concentración de metales en agua y sangre se determinaron por el método de espectrofotometría de absorción atómica y el daño genotóxico por la técnica de electroforesis en gel de células únicas, o ensayo cometa, la cual es reconocida como un biomarcador de efecto temprano, y es utilizada ampliamente para monitorear individuos expuestos ocupacional o ambientalmente a diferentes agentes genotóxicos. Los resultados obtenidos indican que sólo la concentración de arsénico en sangre y en agua de bebida exceden el límite máximo permisible establecido por las agencias reguladoras internacionales y la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994, respectivamente. Así mismo, se encontró una correlación positiva y significativa entre la concentración de

arsénico en la sangre y la inducción de rompimientos de cadena sencilla del ADN, por lo que, la concentración de As en sangre puede ser utilizada como biomarcador de exposición al metaloide presente en el agua de bebida. Además, se encontraron diferencias significativas en el número de rompimientos de cadena sencilla del ADN en el grupo expuesto, comparado con el testigo. Estos resultados confirman que el arsénico induce genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica en los individuos expuestos, lo que implicaría riesgos a la salud en la población de Huautla, Morelos.

Palabras Clave: arsénico, hidroarsenicismo, sangre periférica, linfocitos, rompimientos de cadena sencilla, daño genotóxico, ensayo cometa, biomarcador, Huautla, Morelos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Minería

La minería es la obtención selectiva de minerales y otros materiales provenientes de la corteza terrestre, ésta también corresponde a la actividad económica primaria relacionada con la extracción de elementos (Hartwig *et al.*, 2006) .La minería se divide en metálica y no metálica. En la primera se encuentran el aluminio (Al), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni), oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), plomo (Pb), titanio (Ti), uranio (U) y zinc (Zn); y en la segunda, los elementos no metálicos, que son el azufre (S), carbón (C), cloruros, nitratos, óxidos y sulfuros, entre otros (Duffus, 2002; Hartwig *et al.*, 2006).

La minería en México es una de las actividades económicas de mayor tradición y contribuye, en gran medida, con el desarrollo económico del país, suministrando insumos a industrias como la construcción, metalúrgica, siderúrgica, química y electrónica, la industria minera nacional es mayoritariamente metálica, y se dedica principalmente a la producción de Cu, Zn, Ag y Pb (Hartwig, 1995), y se concentra en trece entidades: Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco Jalisco, Michoacán, Morelos, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (Hartwig, 1995; Velasco *et al.*, 2005).

1.2 Contaminación por actividad minera

La contaminación es la presencia o introducción de cualquier sustancia o forma de energía, en tales concentraciones, que puede provocar daños, irreversibles o no, en el

medio (Carrizales *et al.*, 1999). A nivel mundial, la contaminación del agua, aire y suelo es uno de los problemas más importantes, pues limita el aprovechamiento de los recursos naturales para la flora y la fauna (Grether *et al.*, 2006).

Como consecuencia de varios siglos de esta actividad en nuestro país, se han contaminado el suelo, el aire y los cuerpos de agua, principalmente por: derrames, fugas, incendios, acumulación clandestina de residuos peligrosos y manejo inadecuado del cierre de minas y de jales (Velasco *et al.*, 2004).

Estos últimos se definen como acumulaciones de residuos sólidos generados durante los procesos mineros; es decir, después de remover los minerales de las menas (volumen de roca que contiene minerales como los sulfuros, silicatos, óxidos y metales), que quedan expuestos a la intemperie y, por lo tanto, entran en contacto con el agua de lluvia y cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Mendoza, *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2002). Los jales se caracterizan por presentar altas concentraciones de Ag, Cu, Pb, Zn, As, Cd, Mn y Fe (Mendoza *et al.*, 2002), de los cuales el Pb, Cu, Cd, As y Zn son considerados metales pesados, ya que tienen una densidad mayor de 5 g/cm^3 en su forma elemental, y son potencialmente tóxicos, aún en bajas concentraciones (Anderson, 2003; Velasco *et al.*, 2004).

1.3 Contaminación de agua por actividad minera

El agua es considerada como contaminada cuando sus características naturales están alteradas, de tal modo que la hace total o parcialmente inadecuada para el uso al que es destinada (Carrizales *et al.*, 1999).

La actividad minera, durante todo su proceso, genera desechos que contaminan el ambiente con gran facilidad. En el caso del agua, ésta se contamina directamente, al depositar los desechos sobre ella, por derrames o por sedimentación de los mismos; o indirectamente, a través de la contaminación del suelo (Mejía *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2004). Los principales contaminantes de estos desechos son los metales; por ejemplo, el Pb, Zn, Hg, Ni, Cd y el arsénico (As), que son muy tóxicos para la flora y fauna, terrestre y acuática (Calvo *et al.*, 2003).

En general, la actividad minera ha generado enormes cantidades de desechos tóxicos que contaminan el agua subterránea y superficial, sobre todo, en países en desarrollo como Brasil, China, India, Perú, Argentina, México, Bangladesh, Tailandia, Chile y Hungría (WHO, 2006).

En México, se han producido cantidades muy grandes de residuos peligrosos. Por ejemplo, en Guanajuato, la explotación de plata y oro ha generado más de 1,200,000 toneladas de residuos peligrosos que contienen As, Cu, Zn, Cd, y Pb, y que se encuentran a la intemperie, por lo que, por medio de la lixiviación, contaminan los cuerpos de agua, tal como sucede en algunas regiones de Sonora y Sinaloa (Carrillo-Chávez *et al.*, 2001); en Zimapán, Hidalgo, aún se desconoce la cantidad de desechos mineros que se han generado, pero se estima que existen cerca de 6,930 mg de As por cada kilogramo de jale, y que dichos desechos contaminan el agua del lugar (Méndez y Armienta, 2003); en la región de Taxco, Guerrero se han reconocido siete depósitos de jales que suman un total de 25 millones de toneladas de residuos cuyos contaminantes son Ag, Cu, Pb, Zn, As, Cd y Mn, se sabe también que los pozos de agua cercanos a los jales están contaminados con dichos elementos (Armienta *et al.*, 2003). Un ejemplo más

se encuentra en el estado de Morelos, en donde, por varias décadas, se explotaron principalmente Ag, Pb y Zn. Los distritos mineros más explotados en el estado, por sus contenidos de minerales metálicos, se ubican en el municipio de Tlaquiltenango (Velasco *et al.*, 2005). Durante el proceso de extracción se generaron grandes cantidades de residuos y de material no procesado rico en Pb, Cd y Mn solubles, que se encuentran a la intemperie y al borde de algunos arroyos (Velasco *et al.*, 2004).

Las normas oficiales mexicanas que regulan la contaminación ambiental NOM-003-CNA-1996 y NOM-004-CNA-1996 consideran metales contaminantes del agua al Al, As, Cd, cobalto (Co), Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, vanadio (V) y Zn (Calvo *et al.*, 2003; Craft *et al.*, 2006).

Las sales solubles en agua, que provienen de los metales como el Cd, Hg y Pb, son muy tóxicas y acumulables por los organismos que los absorben; éstos, a su vez, son fuente de contaminación de las cadenas alimenticias (Mendoza *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2002).

Por otro lado, las aguas residuales no tratadas, provenientes de minas, llegan a los ríos, mientras los desechos contaminan las aguas subterráneas. Así mismo, cuando se abandonan metales tóxicos en el ambiente, contaminan el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos (Mendoza *et al.*, 2002; Craft *et al.*, 2006).

Para el caso del As, éste se puede encontrar de forma natural en suelos como los histosoles, ultisoles y en aquellos donde la roca madre esta compuesta por minerales como la arsenopirita, escorodita, nicolita, gersdorfita, esmaltita y realgarita, pero también llega al ambiente a través de la extracción de Ag, Cu, Pb y Zn (Chen *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2004; Ornelas y Márquez, 2006). Cuando el arsénico entra en contacto

con el suelo o agua o subterránea, puede terminar en los cuerpos de agua cercanos, o bien, contaminar de manera directa el agua superficial (Anderson, 2003).

La peligrosidad de los metales pesados es mayor que cualquier otro elemento, debido a que no son química ni biológicamente degradables, una vez emitidos pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años y, además, su concentración en los seres vivos aumenta en la medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación (Romero *et al.*, 2002).

1.4 El caso de Huautla, Morelos

Huautla es una región localizada en el municipio de Tlaquiltenango, al sur del estado de Morelos. En la zona se explotaron alrededor de seis minas durante los siglos XVIII y XIX, de las cuales se obtuvo, principalmente, Pb y Ag (Dorado *et al.*, 2005). Durante los años 50, la compañía “Exploradora de Minas S.A.” explotó cuatro minas en Tlaquiltenango. Actualmente, dichas minas no están en operación y se localizan dentro de una zona que ha sido clasificada como *Reserva de la Biosfera*, por lo que es muy difícil que reinicien su actividad (Velasco *et al.*, 2005).

Debido a la explotación de la riqueza natural en minerales azufrados de Pb y Ag que hay en Huautla, se estima que existen alrededor de 780 mil toneladas de residuos en los cuales el principal contaminante es el plomo, además de otra cantidad de material rico en Cd y Mn (Velasco *et al.*, 2004). Existen dos jales en la región, localizados geográficamente, en los 18° 26´ N y 99° 01´ O, que se encuentran a tan solo 500 m del poblado de Huautla, dispuestos a la intemperie y al borde de una serie de pequeños

arroyos que forman el *Arroyo Grande* que desemboca en el Río Amacuzac (Velasco *et al.*, 2005). De acuerdo con los resultados de Velasco *et al.* (2004), dichos jales poseen elevadas concentraciones de As y Pb (139.2 ± 14.9 y 2297.9 ± 833.2 mg/kg, respectivamente), las cuales se encuentran por arriba de los límites máximos permisibles propuestos por la PROFEPA en 2006 (20 mg/kg para As y 200 mg/kg para Pb), que se encuentran en forma de coloides, lo que favorece su movilización y, por lo tanto, la contaminación de los cuerpos de agua cercanos, lo que significa un riesgo para la salud humana. Además, se sabe que, debido a la actividad minera, los suelos de la región presentan contaminación por As, Pb, Hg y Ag (Velasco *et al.*, 2004). Aunado a esto, los suelos de Morelos contienen de manera natural minerales ricos en arsénico, como la arsenopirita (Velasco *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2005).

Lo anterior favorece un escenario donde el arsénico podría ser uno de los principales contaminantes del agua en esta zona.

1.5 El arsénico

El arsénico es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido de manera natural en la corteza terrestre. Es un sólido de color gris o blanco que se localiza en el grupo 15 de la tabla periódica, su número atómico es 33, tiene un peso molecular de 74.92 g/mol, presenta un punto de fusión de 817 °C y un punto de ebullición de 613 °C, y tiene una densidad de 5.77 g/cm^3 (Gómez-Caminero *et al.*, 2001; Petrusevski *et al.*, 2007). El As posee cuatro estados de oxidación (-3, 0, +3 y +5) ,y generalmente en el suelo y rocas se encuentra como sulfuro de arsénico o como arsenato (AsO_5^+) combinado con metales, en el agua o ambientes oxigenados se presenta como arsenato y en

condiciones reductoras se encuentra como arsenito (AsO_{3+}) (Hering y Chiu, 2000; Petrusovski *et al.*, 2007). El compuesto inorgánico del arsénico más común en el aire es el trióxido de arsénico (As_2O_3), mientras que una variedad de arsenatos y arsenitos se encuentran en el suelo, agua y alimentos (Gómez-Caminero *et al.*, 2001); dentro de los compuestos orgánicos del As están el ácido monometilarsónico (AMM), el ácido dimetilarsónico (ADM), las sales de ambos ácidos, y el ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsónico (roxarseno) (Goyer *et al.*, 1999).

1.6 El Arsénico y efectos en la salud humana

El análisis de los efectos tóxicos del As es complicado, pues éstos dependen de la movilidad del arsénico, la cual varía según su estado de oxidación, estructura química y solubilidad en el medio biológico en que esté presente (Petrusovski *et al.*, 2007). Los compuestos inorgánicos del arsénico son más tóxicos que los compuestos orgánicos, debido a que: presentan valencias (+3 y +5) que les permiten combinarse y reaccionar con otros elementos que pueden ser esenciales (Chen *et al.*, 2002; Reichard *et al.*, 2007); no son solubles en el medio biológico, por lo que se acumulan y permanecen durante más tiempo dentro del organismo (contrario a lo que sucede con el As orgánico, que es excretado en su mayoría por la orina) (Hering y Chiu, 2000); y, al ser metabolizados, con el fin de convertirlos a compuestos solubles, generan metabolitos secundarios y radicales libres que resultan aún más tóxicos que la molécula original (Petrusovski *et al.*, 2007). Además, la toxicidad del As inorgánico aumenta conforme disminuye su estado de oxidación, por lo que los arsenitos son más tóxicos que los arsenatos; mientras que en los compuestos orgánicos, la toxicidad aumenta con el grado

de metilación, pues los compuestos más metilados presentan mayor reactividad bioquímica y pueden interactuar con el oxígeno molecular, generando radicales libres (Hering y Chiu, 2000; Petrusevski *et al.*, 2007).

Debido a que el arsénico es un elemento abundante en la naturaleza y a su toxicidad, la exposición a este metaloide ha generado diversos efectos en la salud humana, los cuales pueden ser agrupados por los sistemas que afecta:

- Respiratorio. Irritación de las membranas mucosas de la nariz y garganta, laringitis, bronquitis y rinitis (Goyer *et al.*, 1999; Vahter, 2008).
- Cardiovascular. Diabetes (Gómez-Caminero *et al.*, 2001), pie negro (Tseng *et al.*, 1968, 1995, 1996), arritmia cardiaca, isquemia cardiaca y cerebrovascular, y anemia (Goyer *et al.*, 1999; Vahter, 2008).
- Gastrointestinal. Nauseas, vómito, diarrea y hemorragia gastrointestinal (Goyer *et al.*, 1999).
- Nervioso. Cefalea, letargia, confusión mental y alucinaciones (Vahter, 2008).
- Dérmico. Dermatitis, hiperqueratosis y formación de zonas hiperqueratosas en manos y brazos, y zonas hiper e hipopigmentadas en cabeza, cuello, espalda, uñas y dientes (Cöl *et al.*, 1999; Duffus, 2002).

Además, se ha visto que el arsénico es un agente teratógeno (Gómez-Caminero *et al.*, 2001; Duffus, 2002) y puede causar muerte por envenenamiento (Gómez-Caminero *et al.*, 2001; Vahter, 2008). En 1980 fue el primer carcinógeno para humanos (grupo 1A) clasificado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) (Abernathy *et al.*, 1999).

1.7 El arsénico y genotoxicidad en humanos

Se han realizado muchos estudios a cerca de los efectos genotoxicos del arsénico, tanto orgánico como inorgánico, bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, y en una gran variedad de tipos celulares. En general, los estudios señalan que el arsénico es capaz de producir daño al ADN, principalmente rompimientos de cadena sencilla (Valverde *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Sordo *et al.*, 2001), y que éstos pueden ser detectados utilizando el ensayo cometa (Li *et al.*, 2001; Hartwig *et al.*, 2006, Lewinska *et al.*, 2007), sin embargo, es difícil identificar el mecanismo de acción que utiliza el As para provocar dicho daño, por lo que se han propuesto varios.

Se ha comprobado que en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a As inorgánico en el agua de bebida, en concentraciones de 0.010 mg/L o mayores, se generan sitios abásicos a través de las especies reactivas de oxígeno que se producen durante su metabolismo (Smith *et al.*, 2000; Yamanaka *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2005). De la misma manera ocurre en linfocitos y células epiteliales incubadas con arsénico inorgánico a una concentración de 2.4 μ M (Li *et al.*, 2001). También se sabe que en individuos expuestos a estas mismas concentraciones de arsénico en el agua de bebida, dicho metaloide oxida y altera las enzimas de reparación del ADN, haciéndolas deficientes (Guillamet *et al.*, 2004) y provocando la formación de sitios retardados de reparación, que también son detectados con el ensayo cometa (Sordo *et al.*, 2001; Meza *et al.*, 2004). El arsénico es capaz de unirse a las cadenas de ADN, ya sea insertándose entre las bases de la molécula (por medio de los puentes de hidrógeno), a través de los enlaces fosfodiester, o uniéndose al nitrógeno 7 de la guanina (Reichard *et al.*, 2007), formando así lo que se conoce como cruzamientos intracadena (entre bases de la

misma cadena) e intercadena (entre las cadenas de ADN) (Mussali, 2001), ambos procesos generan fuerzas de tensión entre los enlaces del ADN, provocando que se contraiga o expanda la doble hélice (Olive *et al.*, 1993; Gómez-Caminero *et al.*, 2001). De la misma manera, se ha visto que, en células epiteliales, fibroblastos y linfocitos, los compuestos inorgánicos del arsénico, como el arsenito, generan aductos en el ADN, es decir, se unen a sus bases; estos aductos son reparados por medio de la excisión de nucleótidos (Andrew *et al.*, 2006), dejando sitios abásicos (Roy y Saha, 2002). También se sabe que el As actúa como agente alquilante, es decir sustituye un grupo carboxilo por un grupo alquilo en las bases del ADN; puede ser que el As incorpore uno o dos grupos alquilo en la base, formando aductos, o que incorpore un grupo alquilo que una a dos bases entre si, generando cruzamientos inter e intracadena (Gichner *et al.*, 2000); y como agente intercalante, formando enlaces covalentes con el ADN y provocando cruzamientos intercadena, o interfiriendo con los procesos de replicación y transcripción (Moore *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2004).

Aunque los mecanismos de acción antes mencionados son distintos, todos son capaces de producir rompimientos de cadena sencilla del ADN, estos podrían representar uno de los factores que contribuyen a la inestabilidad cromosómica.

Por otro lado, se ha visto que el arsénico induce también rompimientos de cadena doble del ADN (Li *et al.*, 2001; Rossman, 2003; Hartwig *et al.*, 2006; Lewinska *et al.*, 2007), aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas (Ostrosky *et al.*, 1991; Gonsebatt *et al.*, 1997; Hartwig *et al.*, 2006), y micronúcleos en células epiteliales y en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos al arsénico, en el

agua de bebida, en concentraciones de 0.005-0.050 mg/L (Gonsebatt *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001).

En cuanto a los efectos mutagénicos del arsénico, existe controversia, pues algunos autores mencionan que dicho metaloide no provoca mutaciones puntuales (Moore *et al.*, 1996; Gómez-Caminero *et al.*, 2001; Mei *et al.*, 2003), mientras que otros aseguran que sí las provoca, y que esto ocurre en genes relacionados con el ciclo celular, como p53 (Hsu *et al.*, 1997; Roy y Saha, 2002; Lewinska *et al.*, 2007).

Por último, se han observado alteraciones en los patrones epigenéticos (hipometilación) del ADN provocadas por exposición crónica al arsénico en el agua de bebida, en concentraciones mayores a 0.025 mg/L, lo que afecta la transcripción de genes relacionados con la reparación del ADN y el ciclo celular (Reichard *et al.*, 2007).

1.8 Técnicas para evaluar genotoxicidad: Ensayo cometa

Existen muchas técnicas para evaluar el daño al ADN, dentro de las más utilizadas están: Aberraciones cromosómicas, Micronúcleos, Ames (revertantes de histidina), Intercambio de cromátidas hermanas, Elusión alcalina y, en los últimos años se ha utilizado la Electroforesis en gel de células únicas o Ensayo cometa (Zhao *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000; Kopjar *et al.*, 2006).

La técnica de ensayo cometa fue propuesta por Ostling y Johanson (1984), para detectar daño al ADN en células individuales. Consistió en una electroforesis de microgeles, donde las células fueron embebidas en agarosa y lisadas con detergentes para liberar al ADN, éste fue sometido a electroforesis bajo condiciones neutras (pH 9.5) y teñido con un fluorocromo que permitió observar la figura de un cometa, con cabeza y

cola. Durante los últimos años, esta técnica ha sufrido varias modificaciones, como el pH de la solución de lisis, el pH de la solución de electroforesis y el tiempo de desenrollamiento del ADN, entre otros (Mussali *et al.*, 2005). De acuerdo con el pH de las soluciones, actualmente se conocen tres variantes del ensayo cometa, cada una permite detectar rompimientos de distinto origen (Mussali *et al.*, 2005), como se muestra en el cuadro 1.

Tabla 1. Daños detectados en el ADN según el pH

pH	7	12.1-12.3	13
Tipo de rompimiento	De cadena doble	De cadena sencilla Sitios retardados de reparación	De cadena sencilla Sitios álcali-lábiles Sitios retardados de reparación

En cuanto a las aplicaciones que posee esta técnica, se han realizado estudios tanto en animales y plantas, como en humanos; en estos últimos, se han evaluado los niveles de daño al ADN en individuos que fuman tabaco (Olive *et al.*, 1993; Kopjar, 2006), que han estado expuestos, de manera ambiental o laboral, a agentes químicos (Poli *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 1999), y que se han sometido a tratamientos médicos con radiación o drogas antitumorales (Pitarque *et al.*, 1999; Gichner *et al.*, 2000), en la identificación de agentes carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos (Li, *et al.*, 2001) y para estudiar los mecanismos de acción de nuevas drogas y agentes antineoplásicos

(Mussali *et al*, 2005), además, se ha utilizado para evaluar la capacidad de reparación del ADN y como biomonitor ambiental (Gillian *et al*, 1995; Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000).

El monitoreo humano implica la utilización de marcadores moleculares y biológicos como indicadores de exposición a los agentes que se encuentran en el ambiente, y puede llevar a la identificación de exposiciones potencialmente peligrosas antes de que aparezcan efectos en la salud, así como al establecimiento de los límites de exposición para minimizar riesgos (Valverde *et al.*, 1999). Existen varios tipos de biomarcadores, dentro de los cuales se encuentran los de exposición, susceptibilidad y de efecto temprano, como es el caso del Ensayo cometa, que indica una respuesta o daño temprano provocado por un agente que aún no ejerce efectos sobre la salud (Sotil *et al.*, 2007).

Dentro de las ventajas que posee esta técnica, podemos mencionar que detecta hasta 15,000 rompimientos de ADN por célula, el tamaño de las muestras biológicas necesario es muy pequeño (1.5×10^4 células) con respecto a otras técnicas, el material de laboratorio es de bajo costo, se puede realizar en todo tipo celular eucarionte, y bajo condiciones *in vivo* e *in vitro* (Mussali *et al.*, 2005). Como desventaja, se puede decir que se debe conocer a profundidad la edad, dieta, ocupación e historia clínica de cada uno de los individuos examinados, pues de estas variables depende el daño genotóxico basal de cada individuo, y se debe realizar un análisis de regresión para conocer cómo se relaciona cada una de estas variables con el daño genotóxico.

Otros factores que se deben tomar en cuenta para realizar el Ensayo Cometa son los relacionados con el estilo de vida, debido a que se ha reportado que el consumo de

alcohol y consumo de tabaco tienen influencia diferencial sobre los resultados obtenidos (Navasumrit *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Pöschl *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran cantidad de desechos que la actividad minera ha generado en nuestro país, de que no hay un manejo adecuado del cierre de minas y de la frecuente contaminación de los cuerpos de agua asociada a esto, no se han realizado estudios que evalúen la presencia de metales en el agua de bebida en la población de Huautla, Morelos y los efectos genotóxicos de los mismos, lo cual es necesario, para que, en caso de estar afectados, los individuos de esta población reciban la información y atención pertinentes, además de que no se han realizado estudios de este tipo en la zona.

3. HIPÓTESIS

Si los suelos de la región de Huautla, Morelos son ricos en minerales que contienen As y los jales producidos por actividad minera en esta zona han generado más de 780 mil toneladas de desechos, donde dominan el As, Cu, Pb y Zn, se espera que los cuerpos de agua aledaños a esta región se encuentren contaminados por algunos de estos elementos.

Si la comunidad de Huautla, Morelos está sometida a una exposición crónica a dichos metales por medio del agua de bebida, se espera encontrar la presencia de los mismos en la sangre periférica de los individuos, ya que ésta es considerada como un biomarcador de exposición (Valentine, 1979; Morton y Dunnette, 1999; Schoen *et al.*, 2004; Vahter, 2008).

Si la comunidad de Huautla, Morelos está sometida a una exposición crónica a dichos metales (e.g., As, Cu, Pb y Zn) por medio del agua de bebida, y estos metales son genotóxicos, se espera encontrar daño al ADN (rompimientos de cadena sencilla) en linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos a través del agua de bebida.

Se espera que en las poblaciones humanas analizadas exista una influencia de la edad, del consumo de tabaco y la ingesta de alcohol sobre la inducción de daño al, pues esto se ha observado de forma frecuente en otros estudios (Hyland *et al.*, 2002; Pöschl *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005; Fracasso *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2007).

4. OBJETIVOS

General

- Evaluar el daño al ADN en linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos a metales en el agua de bebida, en la población de Huautla, Morelos.

Particulares

- Medir la concentración de metales en el agua de bebida y en sangre periférica tanto de la población expuesta como de la población testigo, mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica.
- Evaluar los efectos genotóxicos de los metales presentes en el agua de bebida y sangre periférica de los individuos de la población expuesta y testigo, mediante la técnica de Electroforesis en gel de células únicas alcalina o ensayo cometa.

5. METODOLOGÍA

5.1 Población testigo

La comunidad Ajuchitlán se localiza dentro del municipio de Tlaquiltenango, en el estado de Morelos, se ubica geográficamente a los 18°28' latitud N y 99°20' longitud O, cuenta con una extensión territorial de 229 Km², su altitud varía de los 900 a los 2,260 msnm, presenta una población de 241 habitantes y su vegetación es característica de la selva baja caducifolia y el clima es semiseco y cálido (García *et al.*, 2000). Esta población se escogió como grupo control debido a que presenta las mismas características ecológicas, socioeconómicas y de estilo de vida que la población expuesta, a diferencia de que su sistema de abastecimiento de agua de bebida proviene de fuentes independientes a las de la población expuesta.

5.2 Población expuesta

La población de Huautla es una región localizada en el estado de Morelos, dentro del municipio Tlaquiltenango, geográficamente se ubica en los 18°37' latitud N y 98°14' longitud O, es un terreno accidentado con una superficie de 59 km², cuyas altitudes varían de los 700 a los 2,240 msnm, y la vegetación que presenta es de selva baja caducifolia y su clima es cálido. La región es una joya de recursos bióticos y está protegida como una Reserva de la Biosfera, pues alberga numerosas especies vegetales endémicas (Leal *et al.*, 2002), además de que en 2006 fue declarada como Patrimonio de la Humanidad (UNESCO, 2006). Huautla cuenta con una población de

1,114 habitantes, cuya principal ocupación es la agricultura y ganadería, y su nivel socioeconómico es bajo (Velasco *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2005).

El agua de bebida que abastece a la población de esta región proviene del interior de la mina “Pájaro verde”, la cual fue cerrada desde 1993 (Leal *et al.*, 2002), de aquí, el agua es entubada a un depósito donde es clorada y, después, es distribuida a las casas.

5.3 Consentimiento informado

El consentimiento informado se obtuvo por escrito de cada uno de los voluntarios participantes, por duplicado, a través del cual se hizo de su conocimiento los objetivos del estudio, sus alcances y repercusiones sobre su salud, indicando que el estudio es totalmente voluntario (Apéndice I).

5.4 Cuestionario

Se aplicó un cuestionario detallado a cada uno de los individuos participantes en el estudio, para obtener datos generales sobre la población, como el tiempo de residencia en el lugar, la utilización del agua de la mina y del depósito, historia clínica del individuo, ocupación pasada y actual, hábitos alimenticios, y estilo de vida (consumo de alcohol y/o tabaco), así como la exposición a algún otro tipo de agente genotóxico (Apéndice II).

5.5 Criterios de inclusión

Se seleccionaron 22 de 71 individuos encuestados de la población expuesta y 11 de 30 individuos encuestados de la población testigo, los cuales cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Sexo masculino
- Edad de entre 20 y 50 años
- Tiempo de residencia en el lugar mayor a 10 años
- Que no se encontraran bajo ningún tratamiento médico
- Que no se hayan sometido a radiografías en los tres meses previos a la toma de muestras
- Que no se encontraran expuestos a algún otro agente genotóxico
- Que beban agua de los depósitos locales (agua no contaminada), para el caso de la población testigo
- Que beban agua proveniente de la mina, para el caso de la población expuesta
- Sin diagnóstico de enfermedad neoplásica

5.6 Toma de muestras de agua

Para la población testigo, se tomó un total de 27 muestras de agua provenientes de tres depósitos en tres días diferentes, en época de lluvia y sequía. En el caso de la población expuesta, se tomaron 18 muestras de agua provenientes de la mina "Pájaro Verde" y del depósito en tres días diferentes, en época de lluvia y sequía. El método de muestreo se realizó de acuerdo con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana para toma de muestras de agua (NOM 014-SSA1-1993). Se colocaron 2 mL HNO₃ suprapuro en cada

frasco y las muestras fueron transportadas en hielo al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

5.7 Toma de muestras de sangre

Se tomaron 22 muestras de sangre de los individuos de Huautla y 11 muestras de sangre de los individuos de Ajuchitlán, por el método de punción venosa. Se colocaron cinco ml de sangre entera en tubos con K_2EDTA , los cuales se transportaron en hielo al laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM para la determinación de metales en sangre. Para realizar el ensayo cometa, se tomaron tres ml de sangre entera en tubos con heparina, los cuales que fueron envueltos en papel periódico y transportados al Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM , donde se procesaron inmediatamente.

5.8 Medición de metales en agua y sangre

La determinación de metales en agua y sangre se realizó por el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica. Para el caso del Pb y Cd, se empleó el modelo Perkin Elmer 3100 equipado con una cama de granito HGA600, para el caso del Zn y Cu, el modelo Perkin Elmer equipado con flama 2380, y, para el caso del As, el modelo Perkin Elmer 3100 equipado con un generador de hidruros MHS-10. Los experimentos se llevaron a cabo por el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

5.9 Prueba de viabilidad celular

Antes de realizar el ensayo cometa, se llevó a cabo una prueba de viabilidad celular por fluorocromos, la cual permite asegurar que el daño observado con el ensayo cometa es genotóxico y no citotóxico. Esta prueba se hizo para cada individuo, tanto de la población testigo como de la población expuesta. Se tomaron 3 μL de sangre periférica y fueron mezclados con 3 μL de solución de FDA (Diacetato de fluoresceína y Bromuro de etidio), se colocaron en una laminilla, esta fue observada con un microscopio óptico de fluorescencia Olympus BMX60 bajo filtro azul y se obtuvo el porcentaje de células viables (vivas) y no viables (muertas) para 100 células de cada individuo.

Si las células fluorescen de color verde, se les considera viables, esto se debe a que el diacetato de fluoresceína penetra la membrana y entra a la célula, donde es metabolizado por el lisosoma, los productos resultantes de este metabolismo son los que presentan dicho color. En el caso de que las células fluorescan en color rojo, se les considera no viables, pues el bromuro de etidio solamente puede entrar a la célula a través de los poros de membrana que se forman cuando ésta ha perdido su integridad, es decir, cuando la célula está en proceso de muerte (Strauss, 1991).

5.10 Electroforesis en gel de células únicas

Se realizó el Ensayo cometa a pH 13. Se tomaron 10 μL de sangre periférica, los cuales fueron mezclados con 75 μL de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %, se colocaron 75 μL de esta mezcla en una laminilla, previamente cubierta con 150 μL de agarosa regular al 0.5%, deslizando un cubreobjetos sobre la agarosa y dejando gelificar sobre

hielo durante unos minutos se obtuvieron los microgeles, después de retirar el cubreobjetos, una capa de 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión fue agregada como la anterior. Las laminillas fueron colocadas en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, and 10 mM Tris-base, pH 10, 4°C) durante una hora. Después fueron colocadas en una cámara de electroforesis horizontal, donde se dejó desenrollar el ADN durante 20 minutos en solución amortiguadora de electroforesis (300 mM NaOH and 1 mM Na₂EDTA, pH > 13). Se realizó la electroforesis durante 10 minutos a 25 V y 300 mA, bajo luz tenue indirecta. Después de la electroforesis, las laminillas fueron neutralizadas con Tris 0.4 M pH 7.5 y fijadas con etanol durante cinco minutos.

Finalmente se colocaron 50 μ L de una solución de 20 μ g/mL de Bromuro de etidio y un cubreobjetos sobre el gel. La migración del ADN se midió en un microscopio de fluorescencia Olympus BMX60 y con una reglilla colocada en uno de los oculares, en términos de la longitud de la cola, para 100 células de cada individuo.

5.11 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para evaluar el efecto del cuerpo de agua (pozo vs mina) y de la estación (lluvia vs sequía) sobre la concentración de As en el agua.

Se utilizó un ANDEVA de una vía para determinar el efecto del arsénico en sangre, tanto para la población expuesta como para la población testigo, en la inducción de daño al ADN en linfocitos de sangre periférica, medida por el Ensayo cometa.

Posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Tukey para determinar las diferencias entre los niveles de daño al ADN en la población control y la media de daño al ADN de cada individuo de la población expuesta.

Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para identificar la relación entre las diferentes concentraciones de arsénico en sangre y el daño genotóxico. Otra regresión se realizó para cada una de las poblaciones estudiadas, para determinar la relación entre el nivel de daño al ADN y el hábito de fumar tabaco, la ingesta de alcohol y la edad. Los datos fueron transformados con logaritmo natural por tratarse de un análisis paramétrico (Zar, 1999).

Los análisis se realizaron utilizando el programa STATISTICA 6.0 (STATSOFT, 1998).

6. O RESULTADOS

6.1 Concentración de metales en el agua de bebida

Los resultados indican que ninguno de los metales medidos en el agua de bebida de los tres pozos, en la localidad de Ajuchitlán, Morelos (población testigo), rebasa los límites máximos permisibles (LMP), de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.

Cuadro 2. Promedio de la concentración de metales en el agua de bebida de la población testigo (mg/L \pm e.e.)

Metal	Época de lluvia			Época de sequía			LMP
	Pozo			Pozo			
	1	2	3	1	2	3	
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
As	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.025
Cu	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0
Zn	0.01 \pm 0.015	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.008	0.07 \pm 0.021	0.03 \pm 0.012	0.05 \pm 0.002	5.0
Cd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.005

N.D. = No detectable

LMP = Límite Máximo Permisible

En general, la concentración de los metales medidos en el agua de bebida de la población expuesta no rebasa el LMP según la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994, a excepción del arsénico, cuyos niveles de As registrados en la mina superan nueve veces los límites establecidos por la Norma Mexicana antes mencionada, y 22.5 veces los estándares internacionales (0.01 mg/L) (WHO, 2001; EPA, 2001, 2006; FAO, 2006), mientras que los niveles de arsénico en el depósito rebasan ocho veces los límites de la Norma Mexicana y 19.5 veces los establecidos por las organizaciones internacionales (cuadro 3).

Cuadro 3. Promedio de la concentración de metales en el agua de bebida de la población expuesta (mg/L±e.e.)

Metal	Época de lluvia		Época de sequía		LMP
	Mina	Depósito	Mina	Depósito	
Pb	0.007 ± 0.001	N.D	N.D.	N.D.	0.01
As	0.242 ± 0.006	0.244 ± 0.004	0.222 ± 0.005	0.240 ± 0.009	0.025
Cu	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0
Zn	0.1 ± 0.006	0.03 ± 0.00	0.03± 0.007	0.05 ± 0.01	5.0
Cd	N.D	N.D	N.D.	N.D.	0.005

N.D. = No detectable

LMP = Límite Máximo Permisible

No se detectó un efecto significativo del depósito (mina vs depósito) de agua ($F_{3,819}=1$, $p > 0.05$) ni de la estacionalidad (lluvia vs sequía) ($F_{2,637}=1$, $p > 0.05$) sobre las concentraciones de As en el agua de bebida.

6.2 Concentración de metales en la sangre

De acuerdo a los LMP establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000, para individuos adultos no expuestos ocupacionalmente, las concentraciones de Pb (0.2 µg/mL), Cu (1.0 µg/mL), Cd (0.5 µg/mL) y Zn (6.6 µg/mL) en sangre de los individuos de la población testigo se encuentran por debajo. Las concentraciones de As en sangre tampoco rebasan el LMP (0.05 µg/mL) (Smith *et al.*, 2000; ATSDR, 2006; Hall *et al.*, 2006) (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de metales en sangre de individuos de la población testigo ($\mu\text{g/mL}$)

LMP					
Individuo	Pb	Cu	Zn	Cd	As
	0.2	1.0	6.6	0.5	0.05
A	0.12	1.3	5.6	N. D.	N. D.
B	0.12	1.2	7.7	N. D.	N. D.
C	0.18	1.3	6.7	N. D.	N. D.
D	0.12	1.2	7.7	0.002	N. D.
E	0.04	1.3	8.3	N. D.	N. D.
F	0.11	0.9	7.4	N. D.	N. D.
G	0.12	1.1	5.9	N. D.	N. D.
H	0.20	0.9	6.5	N. D.	N. D.
I	0.12	1.2	6.7	N. D.	N. D.
J	0.20	0.8	6.3	N. D.	N. D.
K	0.24	0.9	6.6	N. D.	N. D.
$\bar{x} \pm e.e.$	0.071 ± 0.010	0.987 ± 0.032	6.432 ± 0.245	N. D.	N. D.

N. D. = No detectable

LMP = Límite Máximo Permisible

Los resultados de la concentración de metales en sangre de los individuos expuestos indican que los metales medidos no sobrepasan los LMP establecidos por la Norma Mexicana NOM-199-SSA1-2000 para Pb, Cu, Zn y Cd, a excepción del As, donde se observa que 11 de los 22 individuos evaluados presentan concentraciones elevadas ($>0.05 \mu\text{g/mL}$) de dicho metaloide (cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración de metales en sangre de individuos de la población expuesta ($\mu\text{g/mL}$)

LMP					
Individuo	Pb	Cu	Zn	Cd	As
	0.2	1.0	6.6	0.5	0.05
1	0.04	1	6.6	N.D.	0.02
2	N.D.	0.9	9	N.D.	0.05
3	0.03	1.1	5.1	N.D.	0.05
4	0.09	1	5.4	N.D.	0.03
5	0.05	0.9	5.8	N.D.	0.14
6	0.1	0.8	6.3	N.D.	0.20
7	0.08	0.9	5.1	N.D.	0.03
8	0.14	1	6	N.D.	0.04
9	N.D.	0.9	5.1	N.D.	0.04
10	N.D.	1	6	N.D.	0.09
11	0.13	1	6	N.D.	0.06
12	0.07	0.9	7.2	N.D.	0.09
13	0.06	0.9	11	N.D.	0.04
14	0.06	1	6.5	N.D.	0.05
15	0.05	0.8	6.3	N.D.	0.06
16	0.03	0.8	6.7	N.D.	0.07
17	0.05	0.7	7.1	N.D.	0.09
18	N.D.	0.6	7.2	N.D.	0.03
19	0.16	0.9	4	N.D.	0.03
20	0.17	0.7	5.6	N.D.	0.02
21	N.D.	0.6	7	N.D.	0.04
22	N.D.	0.8	6.3	N.D.	0.02
$\bar{x} \pm e.e.$	0.060 \pm 0.010	0.870 \pm 0.030	6.420 \pm 0.310	N.D.	0.060\pm0.009

N. D. = No detectable

LMP = Límite Máximo Permissible

6.3 Viabilidad celular

El porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos de las muestras de sangre periférica tomadas resultó mayor al 95%, tanto para los individuos de la población testigo ($95 \pm 6.017 \%$) como para los de la población expuesta ($96 \pm 3.674 \%$).

6.4 Genotoxicidad

En la figura 1 se muestran fotografías representativas de los cometas obtenidos de los linfocitos de sangre periférica del grupo control; cada una corresponde a un individuo distinto. Se observan núcleos completamente cerrados y algunos núcleos con el daño genotóxico basal.

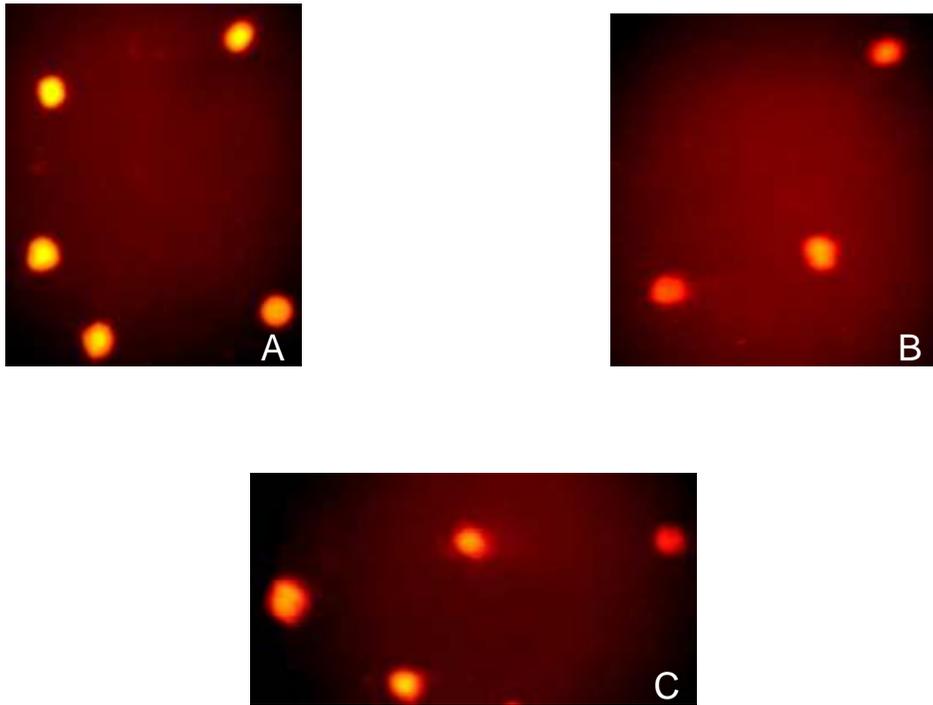


Figura 1. Nucleoides cerrados, sin daño genotóxico, correspondientes a los individuos de la población testigo, obtenidos por la técnica de ensayo cometa a pH alcalino (200X).

En la figura 2 aparecen los cometas de linfocitos de sangre periférica de los individuos del grupo expuesto a As en el agua de bebida; cada fotografía corresponde a un individuo distinto. Se pueden observar núcleos con distinto grado de daño.

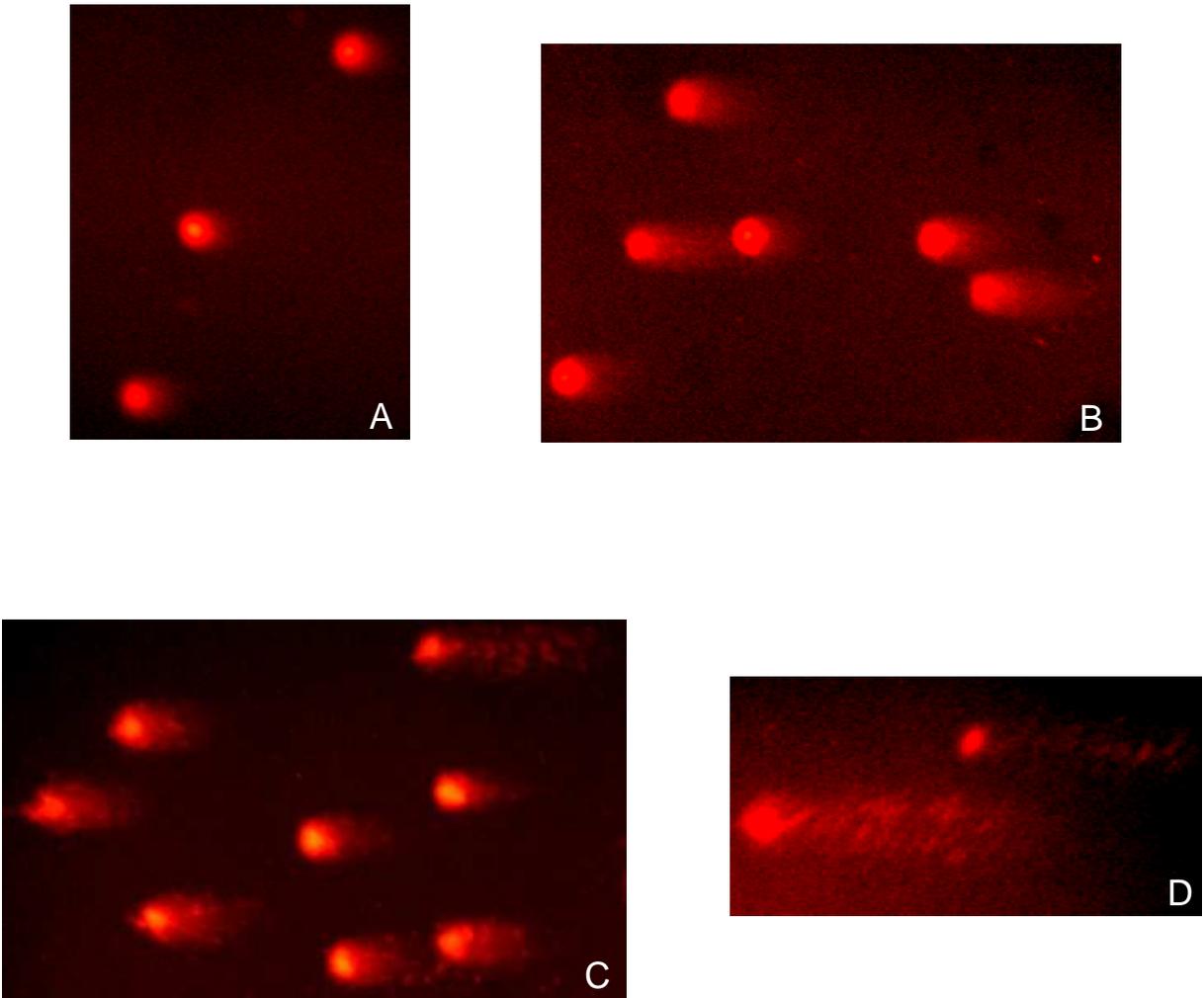


Figura 2. Nucleoides con diferente grado de daño genotóxico correspondientes a los individuos de la población expuesta, obtenidos por la técnica de ensayo cometa a pH alcalino (200X).

Los resultados del análisis de daño al ADN realizado mediante el ensayo cometa pH13 en linfocitos de sangre periférica revelan una diferencia estadísticamente significativa ($F_{1,3298}=1431.83$, $p<0.001$) en la inducción de rompimientos de cadena sencilla entre el grupo expuesto y el grupo testigo (Fig. 3).

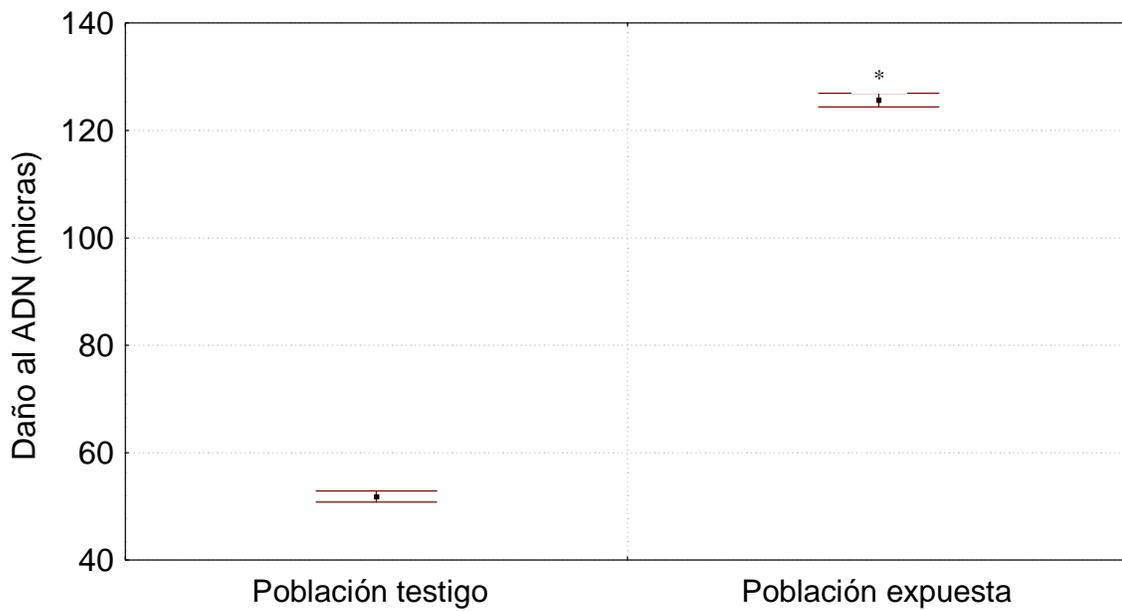


Figura 3. Rompimientos de cadena sencilla del ADN de linfocitos de la población control y de la población expuesta ($\bar{x} \pm e.e.$). * $p < 0.001$

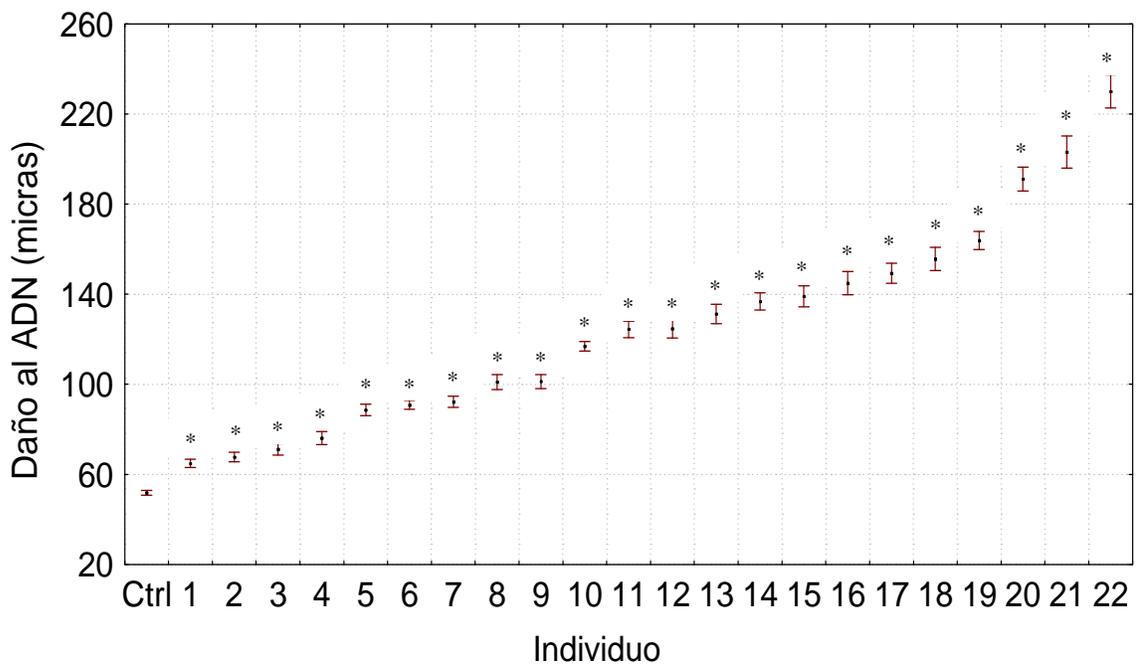


Figura 4. Rompimientos de cadena sencilla del ADN de linfocitos de la población control y cada uno de los individuos expuestos ($\bar{x} \pm e.e.$). * $p < 0.001$

También se encontró que cada uno de los individuos de la población expuesta difiere significativamente de la población control, en cuanto a los rompimientos de cadena sencilla ($F=245.63$, $p<0.001$) (fig. 4).

6.5 Relación entre la concentración de As en sangre y el nivel de daño individual

Se encontró una correlación positiva y significativa ($r=0.46$, $r^2=0.22$, $p<0.05$) entre el nivel de daño (rompimientos de cadena sencilla) y la concentración de As en sangre de cada individuo de la población expuesta.

6.6 Efecto de la edad, consumo de alcohol y consumo de tabaco en la inducción de daño al ADN

Para la población testigo, no se encontró un efecto de la edad ($F_{4,6}=1.155$, $p>0.05$), consumo de alcohol ($F_{1,9}=0.527$, $p>0.05$) o consumo de tabaco ($F_{1,9}=1.037$, $p>0.05$) en los niveles de daño al ADN observados. Mientras que para la población expuesta se registró un efecto significativo del consumo de alcohol ($F_{3,18}=5.391$, $p<0.05$) en los niveles de daño ADN, pero no de la edad ($F_{3,18}=1.836$, $p>0.05$) o consumo de tabaco ($F_{5,16}=3.354$, $p>0.05$).

7. DISCUSIÓN

7.1 Contaminación del agua por arsénico en Huautla, Morelos

Los resultados obtenidos para las concentraciones de metales en el agua de bebida de la población de Huautla, revelan que sólo el As rebasa el LMP establecidos por la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994 y las organizaciones internacionales.

Lo antes mencionado puede deberse a fuentes de contaminación naturales y antropogénicas.

En lo que concierne a las posibles causas naturales, éstas incluyen, por un lado, los suelos ricos en minerales que contienen arsénico, como la arsenopirita, que presenta el estado de Morelos (Velasco *et al.*, 2005), y, por el otro, que el sistema de abastecimiento de agua potable del poblado de Huautla, el cual se obtiene desde el interior de una mina (Leal *et al.*, 2002).

Dentro de las causas antropogénicas se tiene que Huautla, Morelos es una región minera por tradición, de la cual se obtuvieron minerales metálicos como Pb, Ag y Zn durante mas de 200 años (Dorado *et al.*, 2005), y como consecuencia de esta actividad, se generaron dos jales compuestos por más de 780 mil toneladas de desechos tóxicos ricos en metales como As, Cd, Mn y Pb (Velasco *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2005).

Lo anterior es soportado por estudios realizados en diversos lugares del país, como Jalisco (Hurtado y Gardea, 2006), Guanajuato (Carrillo-Chávez *et al.*, 2001; SAPASMA, 2006), Guerrero (Mendoza *et al.*, 2002; Armienta *et al.*, 2003), Hidalgo (Méndez y Armienta, 2003; Valenzuela *et al.*, 2005; Soto-Peña *et al.*, 2006) y Sonora (Meza *et al.*, 2004), entre otros; y alrededor del mundo, como es el caso de India

(Mahata *et al.*, 2003 ; Banerjee *et al.*, 2008), Bangladesh (Smith *et al.*, 2000), España (Calvo *et al.*, 2003), Estados Unidos de América (Meliker *et al.*, 2007) y Chile (Chung *et al.*, 2002), donde la combinación de factores naturales y antropogénicos dan como resultado la contaminación de los cuerpos de agua por. Además, se sabe que, como consecuencia de esta misma actividad, los suelos de la región están contaminados con As y Pb (Velasco *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2005), elementos que podrían mobilizarse y, por lo tanto, contaminar los cuerpos de agua cercanos.

7.2 Concentración de arsénico en el agua de bebida de Huautla, Morelos

Las concentraciones de As obtenidas en el agua de bebida de la población de Huautla fueron de $\bar{x}=0.242\pm 0.006$ mg/L para la mina y $\bar{x}=0.244 \pm 0.004$ mg/L para el depósito, las cuales rebasan el LMP, como se mencionó anteriormente.

Estos valores se encuentran por debajo de los reportados por Soto-Peña *et al.* (2006) (0.412 mg/L) en la región de Zimapán, Hidalgo, por Valverde *et al.* (1999) (0.410 mg/L) y Ostrosky *et al.* (1991) (0.390 mg/L) en el estado de Coahuila, y debajo de los registrados por Carrillo-Chávez *et al.* (2001) y la SAPASMA (2006) (0.300 mg/L) en San Miguel de Allende, Guanajuato. Pero si comparamos las concentraciones obtenidas en este trabajo con las reportadas por Meza *et al.*, 2004 (0.025-0.043 mg/L) en el estado de Sonora, por Valenzuela *et al.* (2005) (0.117 mg/L) en Zimapán y otras regiones de Hidalgo, y con las registradas por Hurtado y Gardea (2006) (0.113-0.262 mg/L) en diversas regiones de Jalisco, se puede observar que los niveles de As en el agua de Huautla se encuentran por arriba de ellas.

Las evidencias mencionadas anteriormente permiten observar que los resultados encontrados en este trabajo se encuentran dentro de los intervalos de concentración de As en agua de bebida encontrados alrededor de nuestro país.

Por otro lado, la exposición que presenta esta población es crónica, es decir, estos individuos han estado expuestos al As, por lo menos, 10 años, ya que desde el cierre de la mina, comenzó el consumo de agua de esta fuente (CONANP-SEMARNAT, 2005).

7.3 Concentración de As total en sangre periférica: Un biomarcador útil

En cuanto a las concentraciones obtenidas para el As en sangre, se observó que el 50% de los individuos expuestos presentan concentraciones elevadas ($0.060 \pm 0.009 \mu\text{g/mL}$), lo que puede deberse a que la sangre no es uno de los órganos blanco del As, solamente es transportado en ella a través de la albúmina y transferrina, por lo que permanece en la sangre durante poco tiempo (30-72 horas) después de la exposición (Goyer *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2002; Meza *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004; Reichard *et al.*, 2007). Aún así, el nivel promedio de As en sangre de los individuos de Huautla, Morelos rebasa el LMP establecido por Smith *et al.* (2000), ATSDR (2006) y Hall *et al.* (2006), que es de $0.050 \mu\text{g/mL}$; por lo que esta población se encuentra expuesta al As mediante el agua de bebida.

El hidroarsenicismo es un problema que presentan muchas poblaciones alrededor del mundo, y nuestro país no está excluido. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado por diversos investigadores (Ostrosky *et al.*, 1991; Valverde *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2003; Mahata *et al.*, 2003; Meza *et al.*, 2004; Valenzuela

et al., 2005; Meliker *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2008), sin embargo, existen solamente seis estudios que relacionen las concentraciones de As total en sangre, de los individuos expuestos, con las concentraciones de As en el agua de bebida. Por ejemplo, se han encontrado concentraciones de As en sangre de 0.010 µg/mL en individuos expuestos a concentraciones de 0.100 y 0.125 mg/L de As en el agua de bebida (Hall *et al.*, 2006; Gamble *et al.*, 2007); concentraciones de 0.046 y 0.049 µg/mL de As en sangre en individuos que beben agua con As a concentraciones de 0.300 y 1.70 mg/L, respectivamente (Wu *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2007); Valentine 1979, Vahter, 1986 y 1988 encontraron que en sangre el As varía de 0.050 a 0.060 µg/mL en individuos que están expuestos a una concentración de 0.390 mg/L de As en el agua de bebida; por su parte, Vahter *et al.*, 1995 observó una concentración de 0.076 µg/mL de As en sangre periférica de personas expuestas a 0.200 mg/L de As en el agua.

Los estudios antes mencionados apoyan los encontrados en el presente trabajo, pues éstos se encuentran dentro de los intervalos que se han encontrado en otros estudios.

Nuestros resultados muestran que existen diferencias significativas entre las concentraciones de As total en sangre periférica de los individuos expuestos, lo que sugiere factores de susceptibilidad individual, como los sistemas enzimáticos, de dieta y edad, entre otros, ya que éstos varían entre individuos y entre poblaciones (Chung *et al.*, 2002; Schoen *et al.*; 2004; Kopjar *et al.*, 2006). Por ejemplo, una dieta rica en alimentos marinos, como pescados y mariscos, donde se puede acumular el As, permite una elevada concentración del elemento en el organismo (Abernathy *et al.*, 1999). Por otro lado, existe evidencia de que si un individuo presenta deficiencia en la síntesis de S-

adenosilmetionina o colina, enzimas necesarias para el metabolismo de este metaloide, que es realizado en el hígado, no será capaz de realizar el metabolismo del arsénico, por lo que, éste será regresado al torrente sanguíneo, donde podrá ser detectado (Hall *et al.*, 2007; Vahter, 2008). En cuanto a la edad, se ha visto que entre mayor es la misma, menor es la capacidad de metabolizar el As, por lo que éste puede permanecer más tiempo en la sangre (Vahter, 1988; Chung *et al.*, 2002; Vahter, 2008). Además, pueden existir diferencias individuales en cuanto a la exposición a dicho metaloide, si ésta es crónica, los niveles del mismo en sangre pueden permanecer sin modificación (Valentine *et al.*, 1979; Vahter, 1988; Tchounwou *et al.*, 2004; Vahter, 2008). Relacionado con esto, se ha observado que la permanencia de este metaloide en la sangre también está determinada por el tipo de As que se ingiere. Después de la exposición, el As inorgánico tiene una vida media biológica de 72 horas, mientras que el As orgánico presenta una vida media menor a 30 horas (Petrusevski *et al.*, 2007), de esta manera, la concentración de arsénico inorgánico detectada en la sangre puede variar.

Los factores antes mencionados pueden estar provocando las variaciones interindividuales en los niveles de As en sangre en la población de Huautla, Morelos.

Por otro lado, biomarcadores utilizados como indicadores de exposición, los niveles de As en orina, cabello y uñas han sido ampliamente investigados y utilizados con este fin (Goyer *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2005; Gamble y Liu, 2005; Hughes, 2006; Sun *et al.*, 2007; Vahter, 2008). En lo que se refiera a los niveles de As en sangre, éstos no han sido aceptados del todo como indicadores confiables de exposición, por lo que pocos autores los han utilizado, esto se debe a que la vida media del As en sangre es

corta (30-72 horas) (Karagas *et al.*, 2000) y a que en este fluido es muy difícil determinar especies particulares del metaloide, por lo que, se ha publicado que esta medición solamente puede reflejar exposiciones en días recientes y a dosis elevadas, es decir, exposiciones agudas (Sun *et al.*, 2007). Por su parte, Valentine (1979), Morton y Dunnette (1999), Schoen *et al.* (2004) y Vahter (2008) proponen que, en exposiciones crónicas al metaloide, las concentraciones del mismo en sangre se mantienen constantes, por lo que resulta un excelente biomarcador en este tipo de exposición.

Para el caso de las exposiciones crónicas al As en el agua de bebida, aunque sean muy pocos los autores que las han estudiado, existe controversia en cuanto a la utilización de la concentración de As en sangre como biomarcador. Por ejemplo, Valentine *et al.* (1999) y Smith *et al.* (2000), afirman que no existe relación alguna entre las concentraciones de As en agua de bebida y en sangre; mientras que Vahter (1986, 1988, 1995 y 2008), Morton y Dunnette (1999), Hall *et al.* (2006) y Gamble *et al.* (2007) han encontrado que mientras mayor sea la concentración de As en el agua, mayor es la de la sangre, y que esta última es un biomarcador útil de exposición crónica al arsénico en el agua de bebida.

Por otro lado, se han reportado otros parámetros que se relacionan con el As en sangre, además del As en el agua de bebida. Por ejemplo, Goyer *et al.* (1999), ATSDR (2005) y Hughes (2006) han encontrado evidencias de que la concentración de As en cabello y uñas presentan una correlación positiva y significativa con la concentración de As total en sangre periférica de individuos expuestos; y Pellizzari *et al.* (2001) Chung *et al.* (2002), Meza *et al.* (2004), Gamble *et al.* (2005), Hughes (2006), Sun *et al.* (2007) y

Vahter (2008) han observado el mismo tipo de correlación, pero con las concentraciones de metabolitos del As en orina y piel.

Aunque estos biomarcadores han sido ampliamente estudiados, muy poco se sabe sobre la relación que existe entre la concentración de As en sangre y sus efectos genotóxicos. En este estudio se encontró una correlación positiva y significativa ($r=0.46$, $r^2=0.22$, $p<0.05$) entre la concentración de arsénico en sangre y el nivel de daño, es decir, mientras mayor es la concentración de As en sangre, mayor es el nivel de daño genotóxico, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Vuyyuri *et al.* (2006). Por lo que, éste es uno de los primeros estudios que encuentra una correlación positiva y significativa entre la concentración de As en sangre y el daño genotóxico.

Los datos presentados en este estudio apoyan que la concentración de As total en sangre periférica puede ser utilizada como un biomarcador útil y confiable de exposición a dicho metaloide a través del agua de bebida, tal como lo refieren Vahter (1986, 1988, 1995 y 2008), Morton y Dunnette (1999), Hall *et al.* (2006), y Gamble *et al.* (2007).

7.4 Rompimientos de cadena sencilla inducidos por As en individuos expuestos en Huautla, Morelos

Los linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos de Huautla, Morelos presentan daño genotóxico, según los resultados obtenidos con el ensayo cometa.

Existen otros estudios que evalúan la genotoxicidad del As en individuos expuestos a él mediante el agua de bebida, utilizando el Ensayo cometa alcalino; estos se han realizado en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a diferentes

concentraciones del metaloide durante largos periodos de tiempo (más de 10 años). Por ejemplo, Valverde *et al.* (1999) reporta una concentración de As en el agua de bebida de 0.410 mg/L en su población de estudio, Basu *et al.* (2005) encontró una concentración de 0.247 mg/L, Navoni *et al.* (2005) una concentración de 0.130 mg/L y Banerjee *et al.* (2008) una concentración de 0.224 mg/L de As en el agua, y todos ellos reportan diferencias significativas en los rompimientos de cadena sencilla del ADN de los individuos expuestos, comparados con el grupo control, mientras que Gebel (2001) y Gradecka *et al.* (2001), quienes encontraron concentraciones de As mayores a 0.200 mg/L en el agua de bebida, no las reportan, lo que puede atribuirse a diferencias de susceptibilidad entre poblaciones, la cual esta condicionada por la dieta, estado de salud, actividad física y capacidad para metabolizar el As, la cual depende de los niveles de enzimas como la S-adenosilmetionina, colina y metionina, que son las responsables de metilar al arsénico.

Para el caso de Huautla, las diferencias en la inducción de rompimientos de cadena sencilla son estadísticamente significativas comparadas con el control, por lo que se puede decir que en esta población el As en el agua de bebida presenta un efecto genotóxico en los linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos, revelado como rompimientos de cadena sencilla.

De la misma manera, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de daño individual dentro de la población de Huautla, con respecto al control. Esto puede deberse a que los individuos se encuentran expuestos de manera diferencial al As a través del agua de bebida y a ciertos factores del estilo de vida, que son los mismos que determinan las diferencias entre las concentraciones de As en

sangre, aunque su efecto es distinto. Por ejemplo Basu *et al.* (2005), Navoni *et al.* (2005) y Banerjee *et al.* (2008) reportan que los individuos con una dieta balanceada y buen estado de salud y condición física, presentan niveles de daño menores que aquellos individuos que no cumplen con estas condiciones. Por su parte, Pöschl *et al.* (2004), Hoffman *et al.* (2005) e Ishikawa *et al.* (2007) mencionan que el estilo de vida tiene efectos importantes sobre el daño observado, por ejemplo, afirman que los individuos que consumen alcohol y/o tabaco presentan niveles de daño más elevados que los que no los consumen. En cuanto a la edad, se sabe, que mientras mayor es esta, menor es la capacidad de reparación del ADN, por lo que se pueden encontrar niveles mas elevados de daño que en los jóvenes (Chung *et al.*, 2002; Petrushevsky *et al.*, 2007), aunque otros autores, como Bolukbas *et al.* (2006) y Chen *et al.* (2007), no reportan la existencia de una relación entre la edad y el daño genotóxico. En cuanto al metabolismo del As, se dice que en los individuos que presentan menor capacidad para metilar al metaloide, debido a que tienen niveles bajos de S-adenosilmetionina, metionina o colina, el daño genotóxico es menor, pues los metabolitos del As son mas tóxicos que el que se ingiere (Basu *et al.*, 2001; Rossman, 2003; Basu *et al.*, 2005; Hughes, 2006). Todos estos factores determinan el nivel de daño que presenta cada individuo dentro de una población, que es lo que podría estar sucediendo en Huautla, Morelos.

En cuanto a los mecanismos por los cuales el As puede provocar rompimientos de cadena sencilla del ADN, existen varias posibilidades.

Uno de estos mecanismos es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y los radicales libres (RL) a los que las primeras pueden dar lugar, de esto se sabe que el As es capaz de interactuar con complejos enzimáticos antioxidantes

como el glutatión (GSH), la tioredoxina y la superóxido dismutasa (SOD), inhibiendo su actividad y provocando un incremento en la cantidad de ERO's como el peróxido de hidrógeno (Basu *et al.*, 2001; Rossman, 2003); también puede activar a la NAD(P)H oxidasa, una enzima localizada en la membrana de células endoteliales y otras, que se encarga de catalizar la reducción de O₂ a ión superóxido y otras ERO's (Schoen *et al.*, 2004; Hughes, 2006); además, durante el metabolismo del metaloide se generan ERO's y RL (Smith *et al.*, 2000; Yamanaka *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2005). El aumento en la cantidad de ERO's y RL genera, por un lado, la oxidación de bases del ADN, que durante la reparación son transformados en sitios abásicos (Basu *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2005; Hughes, 2006) que son revelados como rompimientos de cadena sencilla del ADN durante el Ensayo cometa pH13.

Por otro lado, el As y sus metabolitos son capaces de unirse a las cadenas de ADN, ya sea insertándose entre las bases de la molécula, a través de los enlaces fosfodiéster, o uniéndose al nitrógeno 7 de la guanina (Reichard *et al.*, 2007), formando cruzamientos intra e intercadena (Rossman, 2003); estos dos generan fuerzas de tensión entre los enlaces del ADN (Olive *et al.*, 1993; Gómez-Caminero *et al.*, 2001), lo que puede provocar la formación de rompimientos de cadena sencilla del mismo. De la misma manera, se ha visto que los compuestos inorgánicos del arsénico, como el arsenito, generan aductos en el ADN, que son reparados por medio de la excisión de nucleótidos (Andrew *et al.*, 2006), dejando sitios abásicos (Roy y Saha, 2002) que son interpretados como rompimientos de cadena sencilla; sin embargo este mecanismo está en controversia, pues Navoni *et al.* (2004), Schoen *et al.* (2004) y Banerjee *et al.* (2008) afirman que el As no es capaz de generar aductos.

También se sabe que el As actúa como agente alquilante, es decir sustituye un grupo carboxilo por un grupo alquilo en las bases del ADN; puede ser que el As incorpore uno o dos grupos alquilo en la base, formando aductos, o que incorpore un grupo alquilo que una a dos bases entre si, generando cruzamientos intra e intercadena (Gichner *et al.*, 2000; Andrew *et al.*, 2006); como agente intercalante, formando enlaces covalentes con el ADN y provocando cruzamientos intercadena, que resultan en rompimientos en la cadena sencilla (Moore *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2004).

Relacionado con los procesos antes mencionados, el As provoca la oxidación de algunas enzimas de reparación del ADN, como la glicosilasa, APE-1 endonucleasa, ARN polimerasa II, ADN polimerasa β y las ligasas, pero principalmente la Poli(ADP)ribosa polimerasa (PARP) involucrada en la reparación por excisión de bases (Basu *et al.*, 2001; Rossman, 2003; Guillamet *et al.*, 2004; Schoen *et al.*, 2004; Basu *et al.*, 2005; Hughes, 2006), de esta manera, el As induce una deficiencia en la reparación de los rompimientos de cadena sencilla del ADN y favorece la formación de sitios retardados de reparación, que también son detectados con el Ensayo cometa (Sordo *et al.*, 2001; Meza *et al.*, 2004).

Recientemente, se han comenzado a estudiar las alteraciones epigenéticas que este metaloide puede ocasionar. Aunque son muy pocas las evidencias encontradas, se dice que, debido a que el metabolismo del As y la metilación del ADN comparten procesos como el realizado por la S-adenosilmetionina (SAM), el As demanda, casi en su totalidad, el consumo de la SAM, por lo que ésta se produce en exceso y se acumula, provocando una hipermetilación en ciertas regiones del ADN y silenciando genes como p53 (Basu *et al.*, 2005; Hughes, 2006), y dado que p53 esta involucrado en la reparación

(Rossman, 2003), se pueden estar generando y acumulando daños como los rompimientos de cadena sencilla.

7.5 Influencia del estilo de vida en los resultados obtenidos con el Ensayo cometa

En el caso de la población control, no se encontró efecto por la edad, consumo de alcohol o consumo de tabaco en los niveles de daño al ADN obtenidos.

Para la población expuesta, no se observó un efecto significativo por la edad o consumo de tabaco, lo que puede deberse a que, si bien es cierto que conforme avanza la edad disminuyen los mecanismos de reparación y mantenimiento del ADN, también es cierto que la susceptibilidad individual participa, por lo que individuos de diferentes edades pueden presentar los mismos niveles de daño genotóxico y viceversa, y esto está condicionado, entre otras causas, por el metabolismo, la dieta y la actividad física, tal como lo mencionan Bolukbas *et al.* (2006) y Chen *et al.* (2007); además, la cantidad de tabaco que consumen estos individuos es pequeña (de uno a tres cigarrillos por día) y solamente en individuos donde los niveles de consumo de éste son elevados (de dos a tres cajetillas por día) se han observado influencias en el nivel de daño genotóxico (King *et al.*, 1997; Pitarque *et al.*, 1999; Hyland *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2005; Fracasso *et al.*, 2006).

Por otro lado, se registró un efecto significativo ($F_{5,14}=5.391$, $p<0.05$) del consumo de alcohol en los niveles de daño al ADN encontrados en los individuos de la población expuesta, resultado que concuerda con los obtenidos en otros estudios (Navasumrit *et al.*, 2000; Pöschl *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2007). Esto podría ser atribuido a que el alcohol induce la producción de ERO's durante su metabolismo (Pöschl *et al.*, 2004;

Ishikawa *et al.*, 2007), que, como ya se mencionó anteriormente, generan rompimientos de cadena sencilla del ADN que son detectados con el ensayo cometa pH 13. Además, en esta población el consumo de alcohol es elevado (mayor a tres veces por semana), por lo que sus efectos se reflejan al cuantificar los rompimientos de cadena sencilla del ADN. Además de las ERO's, Navasumrit *et al.* (2000) y Pöschl *et al.* (2004), mencionan que el daño genotóxico observado en individuos que ingieren bebidas alcohólicas puede deberse a los metabolitos secundarios que genera el etanol, como el acetaldehído, y a los niveles de las enzimas encargadas de este metabolismo, como la alcohol deshidrogenasa-2 y acetaldehído deshidrogenasa, que son diferentes en cada individuo. Por su parte, Ishikawa *et al.* (2007) afirma que, como producto de las ERO's producidas durante el metabolismo del alcohol, los niveles de antioxidantes como las vitaminas C y E disminuyen, por lo que puede observarse mayor daño genotóxico. Por otro lado, el efecto del consumo de alcohol en el daño genotóxico evaluado por el ensayo cometa, se ha observado en poblaciones donde dicho consumo es elevado (mas de dos veces por semana), tal como es el caso de la población de Huautla, Morelos (Navasumrit *et al.*, 2000).

Estos resultados reafirman la importancia de tomar en cuenta los aspectos del estilo de vida de cada individuo de la población que se estudia para poder relacionarlos con el daño genotóxico, pues cada población responde diferente a la exposición a As en el agua de bebida, como se puede observar en este trabajo.

7.6 Riesgos y soluciones

El monitoreo humano involucra la utilización de biomarcadores como indicadores de exposición a los agentes que se encuentran en el ambiente. Por lo tanto, este monitoreo podría llevar a la identificación de exposiciones potencialmente peligrosas antes de que se manifiesten efectos en la salud, que es lo que se logra con biomarcadores como el Ensayo cometa (Rojas *et al.*, 1999).

En este estudio se encontró que los individuos de la población de Huautla, Morelos se encuentran expuestos a As en el agua de bebida y que este tiene efectos genotóxicos en linfocitos de sangre periférica de los mismos, y que hay una relación positiva y significativa entre el arsénico en sangre y la inducción de rompimientos de cadena sencilla. Lo anterior propone que el As esta provocando un daño que, posteriormente, podría dar lugar a efectos negativos en la salud, y que los individuos presentan mayor riesgo a desarrollar enfermedades relacionadas con el arsénico, como daño reproductivo, enfermedades cardiovasculares, dérmicas y neoplasias, por lo que es necesario realizar estudios a mediano y largo plazo para evidenciar los riesgos que corre esta población.

Por todo lo anterior, se plantean varias soluciones para disminuir el riesgo de enfermedad en esta población:

- 1) El tratamiento del agua de bebida con métodos físicos, como la ósmosis inversa y nanofiltración, que involucran la utilización de membranas sintéticas permeables al metaloide (Goyer *et al.*, 1999) y donde se logra remover hasta el 95% del As presente (EPA, 1997). También pueden utilizarse tratamientos químicos, donde

minerales absorbentes de As, como la hematita y zeolita, lo capturan y facilitan su remoción del cuerpo de agua (EPA, 1997; IMTA, 2006).

- 2) Los cuerpos contaminados con As pueden ser limpiados con procesos biológicos, es decir, puede ser utilizada la bioremediación. El Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), en 2006, comenzó el desarrollo de un proceso de remoción del arsénico de los cuerpos de agua, se ha planteado la utilización de bacterias que sean capaces de absorber y almacenar el metaloide.
- 3) Cambiar la utilización del agua de la mina por aquella proveniente de pipas o pozos potables.

Sin embargo, el costo de estos tratamientos es elevado y no se encuentran al alcance de esta población, por lo que se proponen otras posibles soluciones, como:

- 1) Como el metabolismo de este metaloide, llevado a cabo con el fin de solubilizarlo y facilitar su excreción, requiere del proceso de metilación (Rossman, 2003; Petrusevski *et al.*, 2007; Reichard *et al.*, 2007), puede ser que esta toxicidad se vea reducida si se ingieren compuestos como la colina, metionina y S-adenosilmetionina, que son donadores de grupos metilo (Hering y Chiu, 2000; Reichard *et al.*, 2007), aunque se debe tomar en cuenta que, la mayoría de las veces, los compuestos metilados de este metaloide resultan más tóxicos que el As en su forma ingerida (Rossman, 2003; Yamanaka *et al.*, 2004; Petrusevski *et al.*, 2007; Vahter, 2008), por lo que, no han podido ser implementados como terapia para las poblaciones expuestas a As. Una dieta abundante en alimentos que contienen antioxidantes, como los vegetales, podría disminuir el efecto

genotóxico del As, contrarrestando las ERO's producidas durante el metabolismo del mismo (Goldfrank *et al.*, 1998; Petrusevski *et al.*, 2007).

- 2) Se ha propuesto la utilización de agentes quelantes del As, como el selenio y compuestos ricos en grupos sulfhidrilo, por los que el As tiene gran afinidad, como el dimercaprol, D-penicilamina y N-acetilcisteína, como tratamientos para personas expuestas a través del agua de bebida, debido a que unen al metaloide y lo neutralizan, disminuyendo su actividad biológica (Tintinalli *et al.*, 1996; Ellenhorne, 1997; Goldfrank *et al.*, 1998). Otro de los tratamientos que se encuentran bajo investigación es la utilización de análogos del dimercaprol que sean solubles en agua y menos tóxicos que este, como el ácido 2,3-dimercaptosuccínico y el ácido dimercaptopropano sulfónico (Petrusevski *et al.*, 2007; Vahter, 2008).
- 3) Para mitigar los efectos tóxicos del As, se puede reducir la absorción del mismo, administrando sustancias que se unan al metaloide en el tracto intestinal. Por ejemplo, el carbón activado ha sido utilizado para este propósito, y como el As pentavalente es un análogo del fosfato (Tintinalli *et al.*, 1996; Ellenhorne, 1997; Goldfrank *et al.*, 1998), la administración de sustancias que unen al fosfato, como el hidróxido de aluminio (Goyer *et al.*, 1999), podrían resultar útiles.

No obstante, todas estas propuestas siguen en prueba, por lo que se necesita realizar más investigaciones de este tipo para poder esclarecer una solución adecuada al problema de hidroarsenicismo.

8. CONCLUSIONES

- La concentración de arsénico en el agua de bebida de la población de Huautla, Morelos, sobrepasa el LMP, por lo que esta población está expuesta a arsénico mediante este recurso. Esto representa un problema más de hidroarsenicismo en México.
- La concentración promedio de arsénico en la sangre periférica de los individuos expuestos rebasa el límite máximo sugerido, lo cual corrobora la exposición a este metaloide.
- Hay un efecto altamente significativo del arsénico sobre la inducción de rompimientos de cadena sencilla del ADN en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a través del agua de bebida, comparado con los individuos de la población control.
- Existe una correlación positiva entre la concentración de arsénico en sangre y el nivel de daño que presenta cada individuo de la población de Huautla, Morelos, lo que corrobora a este biomarcador como útil y confiable para evaluar exposición al arsénico.
- Se registró un efecto estadísticamente significativo del consumo de alcohol en los niveles de daño al ADN en los individuos de la población expuesta, resultado que

puede ser atribuido a los efectos genotóxicos del mismo y a que su consumo es elevado en dicha población.

- Existe una gran diferencia entre los niveles individuales de daño al ADN, lo que podría deberse a la susceptibilidad individual para el metabolismo del As.
- Este es el primer estudio que refiere contaminación del agua de bebida por arsénico en la zona de Huautla, Morelos y riesgo a la salud.

9. APÉNDICE I

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título del Protocolo: “Estudio sobre la inducción de daño al ADN en sangre periférica y epitelio bucal de individuos expuestos a metales en el agua de bebida en una población de Huautla, Morelos”

Investigador Principal: Biól. Patricia Mussali Galante / Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Nombre del paciente: _____

Descripción / Objetivo del Estudio

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene los siguientes objetivos: conocer si el agua de bebida que utilizan los habitantes de Huautla se ha contaminado por los jales y si esta situación ha ocasionado algún daño en los linfocitos (células de la sangre) o en las células de la boca. Antes de participar en este estudio de investigación, debe usted comprender los riesgos y beneficios para decidir si desea participar. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase en la libertad de preguntar para aclarar cualquier duda que tenga respecto al estudio o al procedimiento. Este documento contiene información detallada sobre el estudio de investigación. Una vez que ha comprendido el estudio, se le pedirá que firme esta hoja de consentimiento, si es que usted desea participar. Se le entregará una copia firmada y fechada de esta forma.

Procedimiento del estudio

En caso de aceptar su participación en el estudio, se le realizarán algunas preguntas sobre sus antecedentes médicos y estilo de vida, el cual tendrá una duración aproximada de 45 min. Posteriormente se le pedirá una muestra de sangre periférica (del brazo), se tomará la muestra en tubos vacutainer de 6 mL estériles. En otro día se les pedirá una muestra de raspado bucal, lo que implica raspar el cachete una vez de cada lado, lo cual tendrá una duración de 5 segundos.

Beneficios del estudio

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que los jales abandonados al aire libre y sin control pueden representar un riesgo para la salud humana, por que contienen compuestos que pueden ser tóxicos, los cuales se pueden respirar o ingerir, por lo que es importante saber si esto está ocurriendo en esta población. Con este estudio usted conocerá si presenta algún dato en las células que estudiemos, de haber estado en contacto con el agua contaminada por los jales y si representa éstos, un riesgo para su salud. Por lo que, este estudio permitirá que en un futuro puedan beneficiarse del conocimiento obtenido.

Riesgos asociados al estudio

Este estudio consta de las siguientes fases:

1.- Contestar un cuestionario el cual solo implica tiempo y no representa ningún riesgo.

2.- Tomar una muestra de sangre. Debido a que la cantidad de muestra es poca (6 mL), es difícil que se presente algún síntoma. Aunque es poco probable, puede presentarse un pequeño hematoma (morete) en el sitio de la toma de muestra.

3.- Tomar la muestra de epitelio bucal no implica ningún riesgo.

NOTA: Todo el material utilizado será estéril, por lo que no hay riesgo de algún tipo de contaminación.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es voluntaria y por tanto puede usted decidir participar o no en esta investigación, sin estar sujeto a alguna sanción y sin que se vea afectada la atención médica presente y futura.

Si usted decide participar, en cualquier momento podrá cambiar de opinión y retirarse del estudio.

Pago:

Usted no recibirá pago alguno por su participación en este estudio.

Costos adicionales:

No habrá costos adicionales para usted como resultado de su participación en este estudio. Ninguna de las pruebas de laboratorio tendrá algún costo para usted.

Confidencialidad:

La información obtenida en este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Derechos de los participantes:

Si tiene alguna duda relacionada a la investigación mientras ésta se realiza, podrá contactar a la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes o a la Biól. Patricia Mussali Galante para que sus inquietudes sean resueltas (56-232360 / 56-232184) en el Departamento de Biología Celular y Tisular, Edificio A, 3er piso, Facultad de Medicina, UNAM.

CONSENTIMIENTO

Yo, _____, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que la información obtenida en el estudio puede ser publicada o difundida con fines científicos, sin embargo, también entiendo que mis datos personales no serán publicados y que serán mantenidos con estricta confidencialidad.

Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o representante legal

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o representante)

He explicado al sujeto nombrado anteriormente la naturaleza y los propósitos de la Investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He preguntado si tiene alguna duda y he contestado a las preguntas en la medida de lo posible.

Firma del Investigador

Fecha

Estado civil: casado_____ soltero_____ divorciado_____ otro_____

Dirección_____

Teléfono casa_____ No tengo teléfono _____

Escolaridad: primaria_____ secundaria_____ preparatoria_____ universidad_____
ninguna_____

Ocupación_____

¿Desde hace cuanto tiempo reside usted en el poblado de Ajuchitlán?

Menos de 5 años_____ Entre 5 y 10 años_____ entre 10 y 20 años_____ mas de 20 años_____ Desde mi nacimiento hasta ahora_____

B.- ESTILO DE VIDA

Es usted fumador? Si_____ No_____

En caso de que la respuesta haya sido (SI), favor de contestar lo siguiente:

¿Desde hace cuanto tiempo empezó usted a fumar?

¿Cuántos cigarros fuma al día?

Menos de una cajetilla_____ Una cajetilla_____ Mas de 1 cajetilla_____ Mas de dos cajetillas_____

Ingiere usted bebidas alcohólicas? Si_____ No_____

En caso de que la respuesta haya sido (SI) favor de contestar lo siguiente:

Con que frecuencia ingiere bebidas alcohólicas?

Todos los días_____ Dos veces por semana_____ Una vez a la semana_____ Una vez al mes_____ raramente_____

Ha estado en contacto con algún compuesto químico en los últimos tres meses

Si_____ No_____

¿Con cuales agentes ha tenido contacto? ¿Pesticidas?

C.- CONSUMO DE AGUA.

¿De donde toma el agua que utiliza para beber? Favor de marcar solamente una opción con una paloma ()

1.- _____ Utilizo agua embotellada de la tienda más cercana.

2.- _____ Utilizo agua embotellada de la tienda más cercana y algunas veces de los pozos del pueblo de Ajuchitlán.

3.- _____ El agua que utilizo para beber solamente proviene de los pozos de Ajuchitlán.

D.- HISTORIA CLÍNICA

Tiene usted hijos? Si _____ No _____ ¿Cuántos? _____

En caso de que la respuesta anterior haya sido "SI", favor de contestar lo siguiente:

Como ha sido el desarrollo de embarazo de su pareja?

Normal _____ Con dificultades _____

En caso de haber presentado alguna dificultad ¿Cual? Favor de especificar

Ha tenido problemas para tener hijos? Si _____ No _____

En caso de que la respuesta anterior haya sido "SI", favor de contestar lo siguiente:

Desde hace cuanto tiempo ha presentado esta condición? _____

Ha consultado a algún médico? Si _____ No _____

¿Cual fue el diagnostico o la explicación que le dio el médico acerca de esto?

Esta usted bajo algún tratamiento? Si _____ No _____
Cual? _____

¿Alguna vez su pareja ha presentado abortos? Si _____ No _____

Número de abortos _____

¿Algún medico le ha dicho la razón de estos abortos? Si _____ No _____

En caso de ser "SI", favor de especificar _____

E.- SALUD DE LOS HIJOS:

Considera usted que el desarrollo de sus hijos ha sido normal? Si _____ No _____

¿Que tipo de problema de salud han presentado sus hijos? _____

¿Ha acudido a algún médico? Si_____ No_____

Le han dicho la razón por cual su hijo presenta o ha presentado este problema?

Escolaridad de los hijos:

Hijo 1.- primaria_____ secundaria_____ preparatoria_____ universidad_____
ninguna_____

Hijo 2.- primaria_____ secundaria_____ preparatoria_____ universidad_____
ninguna_____

Hijo 3.- primaria_____ secundaria_____ preparatoria_____ universidad _____
ninguna_____

Hijo 4.- primaria_____ secundaria_____ preparatoria_____ universidad_____
ninguna_____

Dentro de su familia, sabe usted de

Canceres o tumores Si_____ No_____

Diabetes Si_____ No_____

Problemas de presión Si_____ No_____

Azúcar en la sangre Si_____ No_____

Problemas de piel Si_____ No_____

Problemas de dentadura Si_____ No_____

Alguna otra enfermedad la cual no se haya mencionado?

F.- ANTECEDENTES LABORALES

¿Cuál es su trabajo actual?

Si es usted campesino o se dedica al campo, ¿cuales son los pesticidas que utiliza?

¿Cada cuanto los utiliza?

¿Alguna vez trabajó en una mina? Si_____ No_____

Si la respuesta anterior es si favor de contestar lo siguiente:

¿Hace cuanto tiempo trabajo usted en una mina?

¿Cuantos años trabajó en la mina

¿Cuál es o era el nombre de la mina?

Durante las jornadas de trabajo, utilizaba alguna protección (mascaras, cubrebocas) Si_____ No_____

G.- SALUD DEL VOLUNTARIO

¿Ha sufrido de alguna enfermedad o padecimiento?

¿Cuál_____

¿Desde hace cuanto tiempo?_____

¿Toma algún medicamento o tratamiento en este momento? Si_____ No_____

¿Cuál_____

¿Desde hace cuanto tiempo?_____

¿Se ha practicado algún examen médico que involucre radiación, (radiografías) en los últimos tres meses? Si_____ No_____

H.- HABITOS ALIMENTICIOS

¿Consume usted vegetales? Si_____ No_____

De los vegetales que consume, ¿se encuentran los vegetales verdes? (Brócoli, espinacas, calabazas, chicharos, ejotes, chayote etc..) Si_____ No_____

Si su respuesta es "SI" favor de contestar lo siguiente

¿Cada cuanto los consume? (ya sea por separado o en combinación)

_____Muy frecuente

_____Algunas veces

_____rara vez

¿Consume usted carne, pollo, pescado? Si_____ No_____

Si su respuesta es "SI" favor de contestar lo siguiente

¿Cada cuanto los consume? (ya sea por separado o en combinación)

_____Muy frecuente

_____Algunas veces

_____rara vez

¿Cual es el alimento que usted cree que consume con mayor frecuencia?_____

!!!!!!!MUCHAS GRACIAS POR SU TIEMPO!!!!!!

Estado civil: casado_____ soltero_____ divorciado_____ otro_____

Dirección_____

Teléfono casa_____ No tengo teléfono _____

Escolaridad: primaria_____ secundaria_____ preparatoria_____ universidad_____
ninguna_____

Ocupación_____

¿Desde hace cuanto tiempo reside usted en el poblado de Huautla?

Menos de 5 años_____ Entre 5 y 10 años_____ entre 10 y 20 años_____ mas de 20
años_____ Desde mi nacimiento hasta ahora_____

B.- ESTILO DE VIDA

Es usted fumador? Si_____ No_____

En caso de que la respuesta haya sido (SI), favor de contestar lo siguiente:

¿Desde hace cuanto tiempo empezó usted a fumar?

¿Cuántos cigarros fuma al día?

Menos de una cajetilla_____ Una cajetilla_____ Mas de 1 cajetilla_____ Mas de dos
cajetillas_____

Ingiere usted bebidas alcohólicas? Si_____ No_____

En caso de que la respuesta haya sido (SI) favor de contestar lo siguiente:

Con que frecuencia ingiere bebidas alcohólicas?

Todos los días_____ Dos veces por semana_____ Una vez a la semana_____ Una vez al
mes_____ raramente_____

Ha estado en contacto con algún compuesto químico en los últimos tres meses

Si_____ No_____

¿Con cuales agentes ha tenido contacto?

C.- CONSUMO DE AGUA.

¿De donde toma el agua que utiliza para beber? Favor de marcar solamente una opción con una paloma
()

1.- _____ Utilizo agua embotellada de la tienda más cercana.

2.- _____ Utilizo agua embotellada de la tienda más cercana y algunas veces del depósito del pueblo de Huautla.

3.- _____ El agua que utilizo para beber solamente proviene del depósito del pueblo de Huautla.

Si usted eligió la opción 3, favor de contestar lo siguiente:

¿Sabe usted de donde proviene el agua del depósito? Si _____ No _____

¿Esta agua proviene de la mina PAJARO VERDE? Si _____ No _____

¿Desde hace cuanto tiempo usted utiliza esta agua para beber?

¿Para que otros fines utiliza esta agua?

D.- HISTORIA CLÍNICA

Tiene usted hijos? Si _____ No _____ ¿Cuántos? _____

En caso de que la respuesta anterior haya sido "SI", favor de contestar lo siguiente:

Como ha sido el desarrollo de embarazo de su pareja?

Normal _____ Con dificultades _____

En caso de haber presentado alguna dificultad ¿Cual? Favor de especificar

Ha tenido problemas para tener hijos? Si _____ No _____

En caso de que la respuesta anterior haya sido "SI", favor de contestar lo siguiente:

Desde hace cuanto tiempo ha presentado esta condición? _____

Ha consultado a algún médico? Si _____ No _____

¿Cual fue el diagnostico o la explicación que le dio el médico acerca de esto?

Esta usted bajo algún tratamiento? Si _____ No _____
Cual? _____

¿Alguna vez su pareja ha presentado abortos? Si _____ No _____

Número de abortos _____

¿Algún medico le ha dicho la razón de estos abortos? Si _____ No _____

En caso de ser "SI", favor de especificar _____

E.- SALUD DE LOS HIJOS:

Considera usted que el desarrollo de sus hijos ha sido normal? Si____ No____

¿Que tipo de problema de salud han presentado sus hijos?

¿Ha acudido a algún médico? Si____ No____

Le han dicho la razón por cual su hijo presenta o ha presentado este problema?

Escolaridad de los hijos:

Hijo 1.- primaria____ secundaria____ preparatoria____ universidad____
ninguna____

Hijo 2.- primaria____ secundaria____ preparatoria____ universidad____
ninguna____

Hijo 3.- primaria____ secundaria____ preparatoria____ universidad____
ninguna____

Hijo 4.- primaria____ secundaria____ preparatoria____ universidad____
ninguna____

Dentro de su familia, sabe usted de

Canceres o tumores Si____ No____

Diabetes Si____ No____

Problemas de presión Si____ No____

Azúcar en la sangre Si____ No____

Problemas de piel Si____ No____

Problemas de dentadura Si____ No____

Alguna otra enfermedad la cual no se haya mencionado?

F.- ANTECEDENTES LABORALES

¿Trabajó usted en la mina "PAJARO VERDE"? Si____ No____

Si su respuesta es "SI", favor de contestar lo siguiente:

¿Cuanto tiempo trabajo usted en la mina? (años)_____

¿Cuanto duraba su jornada de trabajo? (horas)_____

¿Utilizaba usted alguna protección (mascaras, guantes, etc.) durante su jornada laboral?_____

¿Desde hace cuanto tiempo dejo de trabajar en la mina?_____

¿Cuál es su empleo actual? _____

G.- SALUD DEL VOLUNTARIO

¿Ha sufrido de alguna enfermedad o padecimiento?

¿Cuál _____

¿Desde hace cuanto tiempo? _____

¿Toma algún medicamento o tratamiento en este momento? Si _____ No _____

¿Cuál _____

¿Desde hace cuanto tiempo? _____

¿Se ha practicado algún examen médico que involucre radiación, (radiografías) en los últimos tres meses? Si _____ No _____

H.- HABITOS ALIMENTICIOS

¿Consume usted vegetales? Si _____ No _____

De los vegetales que consume, ¿se encuentran los vegetales verdes? (Brócoli, espinacas, calabazas, chicharos, ejotes, chayote etc..) Si _____ No _____

Si su respuesta es "SI" favor de contestar lo siguiente

¿Cada cuanto los consume? (ya sea por separado o en combinación)

_____ Muy frecuente

_____ Algunas veces

_____ rara vez

¿Consume usted carne, pollo, pescado? Si _____ No _____

Si su respuesta es "SI" favor de contestar lo siguiente

¿Cada cuanto los consume? (ya sea por separado o en combinación)

_____ Muy frecuente

_____ Algunas veces

_____ rara vez

¿Cuál es el alimento que usted cree que consume con mayor frecuencia? _____

!!!!!!!MUCHAS GRACIAS POR SU TIEMPO!!!!!!

11. LITERATURA CITADA

- Abernathy, C. O., Y. P. Liu, D. Longfellow, H. Vasken Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson y M. Waalkes. 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental Health Perspectives* 7: 593-597.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2005, 2006). Toxicological profile for arsenic. Department of Health and Human Services, Public Health Service: U. S.
- Anderson, D. 2003. Introduction to heavy metal monitoring. *Center of Ecology and Hidrology* 13: 1-9.
- Andrew, A. S., J. L. Burgess, M. M. Meza, E. Demidenko, M. G. Waugh, J. W. Hamilton y M. R. Karagas. 2006. Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair *in vitro* and in individuals exposed to drinking water arsenic. *Environmental Health Perspectives* 114: 1193-1198.
- Armienta, M. A., O. Talavera, O. Morten y M. Barrera. 2003. Geochemistry of metals from mine tailings in Taxco, Mexico. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology* 72: 387-393.
- Banerjee, M., N. Sarma, R. Biswas, J. Roy, A. Mukherjee y A. K. Giri. 2008. DNA repair deficiency leads to susceptibility to develop arsenic-premalignant skin lesions. *International Journal of Cancer* 123: 283-287.
- Basu, A., J. Mahata, S. Gupta y A. K. Giri. 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research* 488: 171-194.
- Basu, A., A. Som, S. Ghoshal, L. Mondal, R. C. Chaubey, H. N. Bhilwade, M. M. Rahman y A. K. Giri. 2005. Assesment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicology Letters* 159: 100-112.
- Bolukbas, C., F. F. Bolukbas, A. Kocyigit, M. Aslan, S. Selek, M. Bitiren y M. Ulukanligil. 2006. Relationship between levels of DNA damage in lymphocytes and histopathological severity of chronic hepatitis C and various clinical forms of hepatitis B. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21: 610-616.
- Calvo, C., J. Álvarez-Benedí, M. Andrade, P. Marinero y S. Bolado. 2003. Contaminación por arsénico en aguas subterráneas: variaciones estacionales. *Estudios de la zona no saturada del suelo* 6: 91-98.

- Carrillo-Chávez, A., O. Morton-Bermea, E. González-Partida, H. Rivas-Solorzano, V. Garcia-Meza y G. Oesler, 2001. Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico. *Ore Geology Reviews* 23: 277-297.
- Carrizales, L., L. Batres, M. Ortiz, J. Mejía, L. Yáñez, E. García, H. Reyes y F. Díaz. 1999. Efectos en salud asociados con la exposición a residuos peligrosos. *Scientiae Naturae* 2: 5-28.
- Chen, M. L., Q. Ma y W. G. Harris. 2002. Arsenic concentrations in Florida surface soils: influence of soil type and properties. *Soil Science of the American Society Journal* 66: 632-640.
- Chen, J. H., C. N. Hales y S. E. Ozanna. 2007. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?. *Nucleic Acids Research* 35: 7417-7428.
- Chung, J. S., D. A. Kalman, L. E. Moore, M. J. Kosnett, A. P. Arroyo, M. Beeris, D. N. Guha Mazumder, A. L. Hernández y A. H. Smith. 2002. Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environmental Health Perspectives* 110: 729-733.
- Cöl, M., C. Cöl y A. Soran. 1999. Arsenic-related Bowen's disease, Palmer keratosis, and skin cancer. *Environmental Health Perspectives* 107:687-689.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) – Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2005. Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla. CONANP: México.
- Craft, E. S., K. C. Donnelly, L. Neamtiu, K. M. McCarty, E. Bruce, I. Surkova, D. Kim, I. Uhnakova, E. Gyorffy, E. Tesarova y B. Anderson. 2006. Prioritizing Environmental Issues around the World: Opinions from an International Central and Eastern European Environmental Health Conference. *Environmental Health Perspectives* 114: 1813-1817.
- Dorado, O., B. Maldonado, D. M. Arias, V. Sorani, R. Ramírez, E. Leyva y D. Valenzuela. 2005. *Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla*. CONANP, México. 207 pp.
- Duffus, J. 2002. Heavy metals, a meaningless term. *Pure Applications of Chemistry* 74: 793-807.
- Ellenhorn, M. J. 1997. *Diagnosis and treatment of human poisoning*. Williams & Wilkins, U. S.

- Environmental Protection Agency (EPA) (1997). Arsenic in Drinking Water, Treatment Technologies. EPA: U. S.
- Environmental Protection Agency (EPA) (2001, 2006). Safe water standards. NPDWR: U. S.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2006). As contamination of irrigation water soil and crops in Bangladesh. RAP Publication: U. S.
- Fracasso, M., D. Doria, P. Franceschetti, L. Perbellini y L. Romeo. 2006. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicology Letters* 167:131-141.
- Gamble, M. V. y X. Liu. 2005. Urinary creatinine and arsenic metabolism. *Environmental Health Perspectives* 113: 442.
- Gamble, M.V., X. Liu, V. Slavkovich, J. Pilsner, V. Ilievski, P. Factor-Litvak, D. Levy, S. Alam, M. Islam, F. Parvez, H. Ahsan y J. Graziano. 2007. Folic Acid Supplementation Lowers Blood Arsenic. *American Journal of Clinical Nutrition* 86: 1202-1209.
- García, J., R. Jiménez, L. Sánchez, A. Espejo y A. R. López. 2000. Notas sobre el género *Habenaria* (Orchidaceae) en México. *Acta Botánica Mexicana* 50: 27-38.
- Gebel, T. W. 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203: 249-62.
- Gichner, T., O. Ptacek, D. A. Stavreva, E. D. Wagner y M. J. Plewa. 2000. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutation Research* 470: 1-9.
- Gillian, M. R., T. J. McMillan, P. Wilcox y A. R. Collins. 1995. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications, Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutation Research* 337: 57-60.
- Goldfrank, R. L., N. E. Flomenbaum y N. A. Lewin. 1998. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. Appleton and Lange, U. S. 1917 pp.
- Gómez-Caminero, A., P. Howe, M. Hughes, E. Kenyon, D. R. Lewis, M. Moore, J. Ng., A. Aitio y G. Becking. 2001. *Arsenic and arsenic compounds*. WHO: Geneva.
- Gonsebatt, M. E., L.Vega y A. M. Salazar. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutation Research* 386: 219-228.

- Goyer, R., V. Aposhian, K. Brown, K. Cantor, G. Carlson, W. Cullen, G. Daston, B. Fowler, C. Klaassen, M. Kosnett, W. Mertz, R. Preston, L. Ryan, A. Smith, M. Vahter y J. Wiencke. 1999. *Arsenic in drinking water*. National Academy Press, U. S. 309 pp.
- Gradecka, D., J. Palus y W. Wasowicz. 2001. Selected mechanisms of genotoxic effects of inorganic arsenic compounds. *International Journal of Occupational Medicine & Environmental Health* 14: 317-328.
- Grether, J. M., A. M. Nicole y J. De Melo. 2006. Unraveling the World-Wide Pollution Heaven Effect. *Fondazione Eni Enrico Mattei* 122: 2-29.
- Guillamet, E., A. Creus, J. Ponti, E. Sabbioni, S. Fortaner y R. Marcos. 2004. *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19: 129-135.
- Guo, Z., H. Yang, M. L. Hamilton, H. VanRemmen y A. Richardson. 2001. Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorta. *Mechanisms of Ageing and Development* 122: 1771-1786.
- Hall, M., Y. Chen, H. Ahsan, V. Slavkovich, A. van Geen, F. Parvez y J. Graziano. 2006. Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: results from a prospective study. *Toxicology* 225 :225-233.
- Hall, M., M. Gamble, V. Slavkovich, X. Liu, D. Levy, Z. Cheng, A. van Geen, M. Yunus, M. Rahman, J. R. Pilsner y J. Graziano. 2007. Determinants of arsenic metabolism: Blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal new born pairs. *Environmental Health Perspectives* 115: 1503-1509.
- Hartwig, A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8: 3-11.
- Hartwig, A., T. Schwerdtle, I. Hamann, C. Thuy, e I. Walter. 2006. *15th EUROTOX Training and Discussion Session 4*: 16.
- Hering, J. G. y V. Q. Chiu. 2000. Arsenic occurrence and speciation in municipal groundwater based supply system. *International Journal of Epidemiology* 126: 471-474.
- Hoffman, H., C. Isner, J. Högel y G. Speit. 2005. Genetic polymorphisms and the effects of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 20: 359-364.
- Hsu, Y. S., F. M. Tang, W. L. Liu, J. Y. Chuang, M. Y. Lai y Y. S. Lin. 1997. Transcriptional regulation by p53. *The American Society of Biochemistry and Molecular Biology* 270: 6966-6974.

- Hughes, M. F. 2006. Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives* 114: 1790-1796.
- Hurtado, R. y J. L. Gardea. 2006. Arsénico en el agua potable de la región de Los Altos de Jalisco, México. *Revista Panamericana de Salud Pública* 12: 236-247.
- Hyland, P., O. Duggan y J. Turbitt. 2002. Nonagenarians from the Swedish NONA Immune Study have increased plasma antioxidant capacity and similar levels of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells compared to younger control subjects. *Experimental Gerontology* 37:465-73.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). 2006. Remediación de suelos y agua contaminada por arsénico. IMTA: México.
- Ishikawa, H., T. Ishikawa, H. Yamamoto, A. Fukao y K. Yokoyama. 2007. Genotoxic effects of alcohol in human peripheral lymphocytes modulated by ADH1B and ALDH2 gene polymorphisms. *Mutation Research* 615: 134-142.
- Karagas, M. R., T. D. Tosteson, J. Blum, B. Klaue, J. E. Weiss, V. Stannard, V. Spate y J. S. Morris. 2000. Measurement of low levels of arsenic exposure: a comparison of water and toenail concentrations. *American Journal of Epidemiology* 152: 84-90.
- King, C.M., H. E. Bristow-Craig y E. S. Gillespie. 1997. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75-80-year-old humans. *Mutation Research* 377:137-47.
- Kopjar, N., D. Zeljezic y V. Garaj-Vrhovac. 2006. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochimica Polonica* 2: 321-336.
- Leal, M. T., S. Gelover, M. Millán y E. Bendala. 2002. Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla. México. pp 59-65, En: *Relevamiento de comunidades rurales de América Latina para la aplicación de Tecnologías Económicas para Potabilización de Aguas Proyecto OEA AE 141/2001*. Litter, M. y R. Gettar (editores). AICD, México.
- Lewinska, D., J. Arkusz, M. Stanczyk, J. Palus, E. Dziubaltowska y M. Stepnik. 2007. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(a)pyrene-induced micronuclei. *Mutation Research* 176: 1756-1768.
- Li, D., T. Morimoto, T. Takeshita y Y. Lu. 2001. Arsenic induces DNA damage via Reactive Oxygen Species in Human Cells. *Environmental Health and Prevention for Medicine* 6: 27-32.

- Mahata, J., A. Basu, S. Ghoshal, J. N. Sarkar, A. K. Roy, G. Poddar, A. K. Nandy, A. Banerjee, K. Ray, A. T. Natarajan, R. Nilsson y A. K. Giri. 2003. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation research* 534:133-143.
- Mei, N., J. Lee, X. Sun, J. Xing, J. Hanson, X. Lee y M. Weinfeld. 2003. Genetic predisposition to the cytotoxicity of arsenic: the role of DNA damage and ATM. *The FASEB Journal* 16: 18-49.
- Mejía, J., C. Carrizales, V. Rodríguez, M. Jiménez y F. Díaz. 1999. Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pública* 41: 132-140.
- Meliker, J. R., R. L. Whal, L. L. Cameron y J. O. Nriagu. 2007. Arsenic in drinking water and cerebrovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease in Michigan: a standardized mortality ratio analysis. *Environmental health* 6:1-11.
- Méndez, M. y M. A. Armienta. 2003. Arsenic phase distribution in Zimapán mine tailings, Mexico. *Geofísica Ambiental* 42: 131-40.
- Mendoza, O., M. A. Armienta, A. Dótor, N. Flores y J. García. 2002. Metales pesados relacionados con actividades mineras en la región de Taxco, Guerrero. *Geofísica Ambiental* 22: 187-188.
- Meza, M., M. Kopplin, J. Burgess y J. Gandolfi. 2004. Arsenic in drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Environmental Research* 96: 119-126.
- Moore, L., M. L. Wamer, A. H. Smith, D. Kalman y M. T. Smith. 1996. Use Of The Fluorescent Micronucleus Assay To Detect The Genotoxic Effects Of Radiation And Arsenic In Human Exfoliated Epithelial Cells. *Environment and Molecular Mutagenesis* 27: 176-84.
- Morton, W. E. y D. A. Dunnette. 1999. Health effects of environmental arsenic. New York. pp 17-34. En: *Arsenic in the environment Part II: Human health and ecosystem effects*. Nriagu, J. O. (editor). John Wiley & Sons, Inc., U. S.
- Mussali, P. 2001. ¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 113pp.
- Mussali, P., M. R. Avila, G. Piñón, G. Martínez, V. Rodríguez, M. Rojas, M. C. Avila y T. I. Fortoul. 2005. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicology and Industrial Health* 21: 155-166.

- Navasumrit, P., T. H. Ward, N. J. F. Dodd y P. J. O'Connor. 2000. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 21: 93-99.
- Navoni, J. A., S. Farías, M. González, M. Olivera, J. Tschambler, G. Bovi, I. Larripa y E. Villaamil. 2005. Epidemiología del hidroarsenicismo crónica regional endémico en la República Argentina. *Acta Toxicológica Argentina* 12: 12-19.
- Norma Oficial Mexicana para la concentración de metales en el agua de bebida, 1994: NOM-127-SSA1-1994
- Norma Oficial Mexicana para la concentración de metales en sangre, 2000: NOM-199-SSA1-2000.
- Norma Oficial Mexicana para la regulación de la contaminación ambiental, 1996: NOM-003-CNA-1996
- Norma Oficial Mexicana para la regulación de la contaminación ambiental, 1996: NOM-004-CNA-1996
- Norma Oficial Mexicana para la toma de muestras de agua, 1993: NOM 014-SSA1-1993
- Olive, P. L. y J. P. Banáth. 1993. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵I dUrd. *International Journal of Radiation and Biology* 64: 349-358.
- Ornelas, J. y M. Márquez. 2006. Transformación química de minerales del arsénico en la industria minero-metalúrgica. *Boletín de Mineralogía* 17: 39-44.
- Ostling, O. y K. J. Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 123: 291-298.
- Ostrosky, P., M. E. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García, L.M. Del Razo, M.E. Cebrián. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Research* 250: 477-483.
- Pandey, P. K., S. Yadav y M. Pandey. 2007. Human arsenic poisoning issues in Central-East Indian Locations: Biomarkers and Biochemical Monitoring. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4: 15-22.
- Pellizzari, E. D., D. J. Smith y C. A. Clayton. 2001. An assessment of the data quality for NHEXAS-Part I: Exposure to metals and volatile organic chemicals in region 5. *Journal of Exposure and Analysis of Environmental Epidemiology* 11: 140-154.

- Petrusevski, B., S. Sharma, J. C. Schippers y K. Shordt. 2007. *Arsenic in drinking water*. IRC International Water and Sanitation Centre, The Netherlands. 57 pp.
- Pitarque, M., A. Valglenov, M. Nósito, A. Hirvonen, H. Norppa, A. Creus y R. Marcos. 1999. Evaluation of DNA damage by the Comet Assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research 44*: 115-127.
- Poli, P., A. Buschini, A. Spaggiari, V. Rizzoli, C. Carlo-stella y C. Rossi. 1999. DNA damage by tobacco smoke and some antitubercular drugs evaluated using the Comet assay. *Toxicology letters 108*: 267-276.
- Pöschl, G., F. Stickel, X. D. Wang y H. K. Seitz. 2004. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proceedings of the Nutrition Society 63*: 65-71.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) (2006). Informe Nacional de Emisiones y Transferencia de Contaminantes. PROFEPA: México.
- Reichard, J. F., M. Schnekenburger y A. Puga. 2007. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochemical Biophysical Research Communications 352*: 188-192.
- Rojas, E., M. C. Lopez y M. Valverde. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B 722*: 225-254.
- Romero, F. M., M. A. Armienta y L. Villaseñor. 2002. Evaluación de la peligrosidad potencial de jales mineros. *Geofísica Ambiental 22*: 185-186.
- Rossmann, T. G. 2003. Mechanisms of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research 533*: 37-65.
- Roy, P. y A. Saha. 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen. *Current Science 82*: 38-45.
- Sistema de Agua Potable y Alcantarillado de San Miguel de Allende (SAPASMA) (2006). Calidad del agua potable en San Miguel de Allende. SAPASMA: México.
- Schoen, A., B. Beck, R. Sharma y E. Dubé. 2004. Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations. *Toxicology and Applied Pharmacology 198*: 253-267.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2002). Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla. SEMARNAT: México.

- Smith, A. H., E. O. Lingas y M. Rahman. 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the WHO* 78: 1093-1103.
- Sordo, M, L. A. Herrera, P. Ostrosky-Wegman, E. Rojas. 2001. Cytotoxic and genotoxic affects of As, MMA and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* 21: 249-260.
- Sotil, G., R. Alvis, J. Francia y B. Shiga. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el ADN. *Revista Peruana de Biología* 13: 249-253.
- Soto-Peña, G. A., A. L. Luna, L. Acosta-Saavedra, P. Conde, L. López-Carrillo, M. E. Cebrián y M. Bastida. 2006. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *The FASEB Journal* 20: 779-781.
- STATSOFT. 1998. STATISTICA for Windows. Manual version 6.0. Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA.
- Strauss, G. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research* 252: 1-15.
- Sun, G., Y. Xu, X. Li, Y. Jin, B. Li y X. Sun. 2007. Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China. *Environmental Health Perspectives* 115: 648-652.
- Tchounwou, P., J. Centero y A. Patlolla. 2004. Arsenic toxicity, mutagenesis and carcinogenesis – a health risk assessment and management approach. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255: 47-55.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu y Y. F. Sasaki. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.
- Tintinalli, J. E., E. Ruíz y R. L. Krone. 1996. *Emergency medicine: a comprehensive study*. The McGraw Hill Companies, Inc., U. S.
- Thomas, D. J., S. B. Waters y M. Styblo. 2004. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198: 319-326.
- Tseng, W. P., H. M. Chu y S. W. How. 1968. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *Journal of the National Cancer Institute* 40:453-463.

- Tseng, C. H., C. K. Chong y C. J. Chen. 1995. Abnormal peripheral microcirculation in seemingly normal subjects living in blackfoot-disease-hyperendemic villages in Taiwan. *International Journal of Microcircuits Clin Exp* 15:21-27.
- Tseng, C. H., C. K. Chong y C. J. Chen. 1996. Dose-response relationship between peripheral vascular disease and ingested inorganic arsenic among residents in blackfoot disease endemic villages in Taiwan. *Atherosclerosis* 120:125-133.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) (2006). Decreto del Patrimonio de la humanidad Sierra de Huautla. UNESCO.
- Vahter, M. E. 1986. Environmental and Occupational exposure to inorganic arsenics. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 7: 31-34.
- Vahter, M. E. 1988. Arsenic. New York. pp 303-321, En: Clarkson, T. W., L. Friberg, G. F. Nordberg y P. R. Sager (editores). *Biological Monitoring of toxic metals*. Plenum Press, U. S.
- Vahter, M., G. Concha, V. Nermel, R. Nilsson, F. Dulout y A. T. Natarajan. 1995. A unique metabolism of inorganic As in native Anden women. *Environmental Journal of Pharmacology* 293: 455-462.
- Vahter, M. E. 2008. Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic and Clinical pharmacology and Toxicology* 102: 204-211.
- Valentine, J. L., H. K. Kang y G. Spivey. 1979. Arsenic levels in human blood urine and hair in response to exposure via drinking water. *Environmental Research* 20: 24-32.
- Valenzuela, O. L., V. H. Borja-Aburto, G. G. García-Vargas, M. B. Cruz-González, E. A. García-Montalvo, E. S. Calderón-Aranda y L.M. Del Razo. 2005. Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives* 113: 250-254.
- Valverde, M., P. Ostrosky, E. Rojas, T. Fortoul, F. Meneses, M. Ramírez, F. Díaz y M. Cebrian. 1999. The applications of single cell electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Pública de México* 41: 109-113.
- Velasco, J., D. de la Rosa, M. Ramírez y T. Volke. 2004. *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. SEMARNAT-INE, México. 46 pp.
- Velasco, J., D. de la Rosa, M. Ramírez y T. Volke. 2005. *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales, Etapa II*. SEMARNAT-INE, México. 36 pp.

- Vuyyuri, S. B., M. Ishaq, D. Kuppala, P. Grover y Y. R. Ahuja. 2006. Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47: 562-570.
- World Health Organization (WHO) (2001, 2006). Guidelines for drinking-water quality. WHO: Geneva.
- Wu, M. M., H. Y. Chiou, T. W. Wang, Y. M. Hsueh, I. H. Wang y C. J. Chen. 2001. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environmental Health Perspectives* 109: 1011-1017.
- Yamanaka, K., K. Kato, M. Mizoi, Y. An, F. Takabayashi, M. Nakano, M. Hoshino y S. Okada. 2004. The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198: 385-393.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice- Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.
- Zhao, X., J. Niu, Y. Wang, C. Yan, X. Wang y J. Wang. 1998. Genotoxicity and chronic health effects of automobile study on the traffic policemen in the city of Lanzhou. *Mutation Research* 415: 185-190.