



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE CAMBIOS NUCLEARES EN EL
EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS EXPUESTOS A
METALES EN EL AGUA DE BEBIDA EN HUAUTLA,
MORELOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

EDGAR REYNA ROSAS

TUTORA:

PATRICIA MUSSALI GALANTE





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Reyna
Rosas
Edgar
54 85 14 42
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30228294-2
2. Datos del tutor
M en C
Patricia
Mussali
Galante
3. Datos del sinodal 1
Dr
Efraín
Tovar
Sánchez
4. Datos del sinodal 2
M en C
Adriana Elizabeth
González
Villalva
5. Datos del sinodal 3
M en C
J. Rolando
Ramírez
Rodríguez
6. Datos del sinodal 4
Biól
María del Rocío
Esteban
Jiménez
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de cambios nucleares en el epitelio bucal de individuos expuestos a metales en el agua de bebida en Huautla, Morelos
73 p
2009

Agradecimientos

Para que se cumpliera la realización de esta tesis, quiero agradecer a las siguientes personas:

A mis padres que siempre me dieron su apoyo incondicional, por su confianza que para mi fue ciega, creyendo en mi hasta el último momento, dándome seguridad para terminar la tesis y poder entregársela con todo mi afecto por su amor brindado hasta hoy.

A mi hermana Laura, que ha sido en todo momento fuente, inspiración y motivación para hacer mi carrera y tesis, además de que te agradezco tu amistad y consejos para sobrellevar las cosas no solo en el ámbito escolar.

A mi hermosa Queletzu, mi cómplice y motivadora. Por sacarme de todos los baches que tuve en el camino, que con tus grandes consejos pude finalizar siempre con esperanzas la tesis y que con tu amor y amistad has llenado mi vida de una alegría infinita.

A mi hermano y familiares que estuvieron siempre ahí cuando necesite de algo.

A mi tutora Patricia, por ser la persona que más me ha enseñado en mi formación académica, además de todos mis maestros y sinodales que me aportaron consejos útiles para mi formación.

A mis compañeros de carrera y de laboratorio, por hacerme sobrellevar de forma muy grata estos cinco años y continuar hasta hoy en mi vida.

... por fin se detuvo a mirar atrás y ver que había conseguido, un pensamiento lo detuvo, un segundo lo aterró, el tercero quiso que se sentara, finalmente el cuarto llegó, la mirada no volteó, los primeros pensamientos olvidó y la marcha continuó...

Índice

• Resumen	7
I. Introducción.	8
1.1. Minería.	8
1.2. Contaminación de agua por actividad minera.	9
1.2.1. Arsénico.	11
1.3. El caso de Huautla, Morelos.	14
1.4. Contaminación de cuerpos de agua por arsénico.	15
1.5. Efectos a la salud por consumo de agua con arsénico.	16
1.6. Arsénico y genotoxicidad en humanos.	17
1.6.1. Daño al ADN de forma indirecta.	17
1.6.1.1. La creación de especies reactivas de oxígeno (EROS).	17
1.6.1.2. La unión de arsénico con los grupos sulfhidrilos (-SH).	18
1.6.1.3. La polo (ADP ribosa) polimerasa-1.	19
1.6.1.4. El arsénico puede dañar al citoesqueleto.	19
1.6.1.5. Daño en la expresión genética.	20
1.6.2. Daño al ADN de forma directa.	20
1.6.2.1. Formación de aductos.	20
1.6.2.2. Alquilación del ADN.	20
1.7. Pruebas de genotoxicidad.	20
1.7.1. Prueba de Ames.	21
1.7.2. Aberraciones cromosómicas.	21
1.7.3. Intercambio de cromátidas hermanas.	21
1.7.4. Electroforesis de células únicas en gel.	21
1.7.5. Técnica de micronúcleos.	22
1.8. Micronúcleos y cambios nucleares en células del epitelio bucal.	23
1.9. Antecedentes	26
1.9.1. Exposición oral a arsénico y efectos a la salud.	26
1.9.1.1. Estudios a nivel internacional.	26
1.9.1.2. Estudios realizados en poblaciones mexicanas.	30
II. Justificación.	31
III. Objetivos.	32
IV. Metodología.	32
4.1. Población expuesta: Huautla, Morelos.	32
4.2. Población control: Ajuchitlán, Morelos.	33
4.3. Hoja de consentimiento informado.	35
4.4. Cuestionario.	35
4.5. Criterios de inclusión.	35

4.6. Toma de muestras de sangre.	36
4.7. Toma de muestras de agua.	36
4.8. Toma de muestras de epitelio bucal.	36
4.9. Análisis de micronúcleos y cambios nucleares en el epitelio bucal.	37
4.9.1. Preparación de las muestras.	37
4.9.2. Evaluación microscópica.	37
4.9.3. Análisis estadístico.	38
V. Resultados.	39
5.1. Presencia de metales en muestras de agua de la población expuesta y control.	39
5.2. Análisis de las muestras de sangre.	41
5.3. Análisis de los cambios nucleares en las muestras de epitelio bucal.	42
VI. Discusión.	48
6.1. Arsénico en el agua de Huautla, Morelos.	48
6.2. Arsénico en sangre de los pobladores de Huautla, Morelos.	49
6.3. Presencia de micronúcleos y cambios nucleares en el epitelio bucal de individuos expuestos a arsénico en agua de bebida.	52
VII. Conclusiones.	63
VIII. Literatura citada.	65

Resumen

Reyna-Rosas, E. 2009. Evaluación de los cambios nucleares en el epitelio bucal de los individuos expuestos a metales en el agua de bebida en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

La industria minera representa una de las mayores fuentes económicas tanto a nivel mundial como nacional aportando cerca del 0.9% del PIB mundialmente. Sin embargo la obtención de metales trae consigo una gran cantidad de desechos, representando para México el 65% del total de los desechos industriales producidos. Estos desechos son fuente de contaminación de suelo, aire y agua por el depósito de metales en ellos. De manera particular, la ingesta de esta agua contaminada por metales entre ellos el arsénico, puede ocasionar distintas alteraciones celulares, por lo que existen diversas técnicas para evaluar este tipo de daño, entre ellas se encuentra el análisis de micronúcleos y cambios nucleares en el epitelio bucal, el cual es considerado como un biomarcador de daño temprano.

El presente trabajo se realizó en los poblados de Huautla y Ajuchitlán, ambos pertenecientes al municipio de Tlaquiltenango dentro del estado de Morelos, México. Lugar minero hasta la década de los 90' y donde se generaron grandes cuerpos de jales, por lo que los objetivos del estudio fueron evaluar las concentraciones de metales en agua de bebida y sangre periférica así como el análisis de los cambios nucleares presentes en el epitelio bucal de los grupos expuesto y control, por causa de la ingesta de agua contaminada por metales.

El único metal analizado que rebasó los niveles permitidos (NOM-127-SSA1-1994), fue el arsénico en el grupo expuesto, reportando cantidades que rebasan hasta nueve veces los límites permisibles por la misma norma y hasta 22 veces las normas internacionales como la EPA (2004) y ATSDR (2005). Sin embargo para los demás metales analizados, ninguno rebasó los niveles permitidos tanto en el grupo expuesto como en el control. Lo mismo sucedió en las muestras de sangre ya que sólo el arsénico (As) en el grupo expuesto estuvo por arriba de los límites permisibles. Con respecto a los cambios nucleares, se analizaron células binucleadas, cariorrexis, picnosis, yemas nucleares y micronúcleos. Siendo sólo el cambio de cariorrexis en el que no se presentan diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados reportados en este estudio revelan una grave problemática de contaminación del agua por causa del As en el poblado de Huautla, Morelos, además de estar ocasionando distintas alteraciones nucleares en el epitelio bucal de los mismos pobladores. Lo cual, pudiera hacer a los individuos de Huautla más susceptibles a desarrollar enfermedades relacionadas con una alta frecuencia de micronúcleos y cambios nucleares. Por lo que, el presente estudio es importante debido a que es el primero de este tipo en esta zona.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Minería

La minería es una actividad importante para la economía de muchos países como Tailandia, Zimbabwe, Estados Unidos, Canadá, Australia, India y México entre otros, representando hasta el 0.9% del Producto Interno Bruto (MPC 2003). En particular para México, esta actividad se ha desarrollado formalmente desde el siglo XVIII y actualmente este sector es el primer lugar en inversión a exploración minerometalúrgico a nivel latinoamericano (Gobierno de México 2008). Cabe mencionar que la minería consume cerca de un décimo de la energía total utilizada en el mundo y los desechos producidos por ésta actividad, son mayores que los producidos por cualquier otra industria, siendo para México productora del 65% del total de los residuos industriales producidos (Mejía *et al.* 1999, Cortinas de Nava 2006).

La minería se puede realizar a cielo abierto o subterránea, se caracteriza por procesos de extracción simples o complejos que utilizan soluciones capaces de separar los metales deseados de los sedimentos extraídos, esto genera residuos que son conocidos como jales o colas, producto de la mezcla de reactivos químicos con las rocas que contienen a los minerales (Cruz *et al.* 2004, Gutiérrez y Moreno 2005).

Los residuos obtenidos, pueden encontrarse como lodos líquidos o material fino que se asemeja a suelos. Son depositados en contenedores propios para estos compuestos o en su defecto, en las inmediaciones de las minas y plantas de beneficio, en muchos de los casos sin medidas de seguridad, provocando la contaminación de los recursos

naturales como aire, suelo y agua (Mejía *et al.* 1999, Carrizales *et al.* 2004, Cruz *et al.* 2004, Cortinas de Nava 2006).

1.2. Contaminación de agua por actividad minera

La contaminación de cuerpos de agua por la actividad minera, se debe a la mezcla entre residuos provenientes de la obtención de metales y el agua. La unión entre estos elementos puede darse por arrastre y transporte de los desechos mineros por parte de la acción fluvial, provocando que se generen depósitos en cuerpos de agua. La toxicidad y especiación (interacción de los metales con los elementos químicos del agua) va a depender de las características del metal y el agua (Razo *et al.* 2004). Por ejemplo si se sitúan en aguas suaves o duras (determinados por la cantidad de iones de calcio y magnesio) van a modificar las unidades de pH y alcalinidad del agua, por lo tanto intervienen en la biodisponibilidad (facilidad de absorber el metal por un organismo) de los metales (Camacho y Gamboa 2003). Entre los desechos mineros, los metales pesados son considerados los más peligrosos y tóxicos para la salud, debido a su persistencia en el ambiente y donde su densidad llega a ser cinco veces mayor que el agua donde son contenidos (Camacho y Gamboa 2003). Los metales con mayor presencia en aguas contaminadas son mercurio (Hg), plomo (Pb), cromo (Cr), níquel (Ni), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu) y zinc (Zn) además de encontrar metaloides como el arsénico (As). Su toxicidad es mayor en aguas suaves que en aguas duras debido a su biodisponibilidad (Camacho y Gamboa 2003).

Otro aspecto a considerar del acarreo de metales por efecto fluvial, es la formación de drenaje ácido, debido a los sulfuros contenidos en los jales, los cuales se convierten en elementos potencialmente tóxicos (EPTs). Estos componentes son una de las principales causas de la contaminación de cuerpos de agua (Mejía *et al.* 1999, Carrizales *et al.* 2004, Razo *et al.* 2004, Gutiérrez y Moreno 2005, Cortinas de Nava 2006).

Así mismo, las propiedades que contienen los drenajes ácidos se deben al pH ácido y a los aniones de sulfuro y carbonato que presentan los metales. Sin embargo, en muchos casos, la oxidación de los sulfuros no provoca drenaje ácido, debido a que esto ocurre por el balance de los minerales productores de ácidos (sulfuros) y los minerales consumidores del ácido (carbonatos, hidróxidos y feldespatos) como neutralizadores (Cruz *et al.* 2004).

El mecanismo antes mencionado, puede estar ocurriendo en distintos cuerpos de agua, como son: a) aquellos en contacto directo con las minas activas, b) tanques de almacenamiento de agua fluvial, c) canales de agua provenientes de minas y d) pozos por donde está circulando el agua.

Otro aspecto que influye en la concentración y tipo de metales en agua contaminada por desechos, es el tipo de mina con la que se tenga contacto (primero, si es de origen subterránea o superficial, y segundo el tipo de técnicas que se utilicen para la recuperación de los productos finales de estas minas) además de que prevalecerá la contaminación de cuerpos de agua por metales como cadmio, cobre, plomo, zinc y arsénico (Cortinas de Nava 2006).

Uno de los metales más estudiados por sus impactos ecológicos (contaminación de suelos de cultivos, absorción por plantas y la disolución en cuerpos de agua) y daño a la salud por exposición al agua de bebida es el arsénico (Cooper y Gillespie 2001, Carrizales *et al.* 2004, Florea 2004, Andrew *et al.* 2006), el cual se describe a continuación.

1.2.1. Arsénico:

El arsénico es un metaloide con una valencia que puede ir desde -3, hasta +5, su masa atómica es de 74,922, entalpía de evaporación de 34,76kJ/mol, punto de fusión de 817 y punto de ebullición de 887 °K. Las propiedades antes mencionadas le impiden a este metaloide ser destruido de la naturaleza, por lo que, sólo es transformado en distintas isoformas (e.g. As V y As III) o separado de partículas con las que interactuaba originalmente (Salnikow y Zhitkovich 2008).

Otra vía en que el As puede ser depositado en el agua, es a través de la disolución de las rocas de origen sulfúrico, actividad volcánica e industrias químicas (e.g. producción de vidrio, semiconductores y fundición de metales) (ATSDR 2005, Vahter 2008).

En depósitos de agua bien oxigenadas, el As se localiza superficialmente, encontrando principalmente arsénico V, que es la especie más frecuente. De manera contrastante, el As III es la forma predominante en lugares poco oxigenados, como en sedimentos de lagos profundos o en agua subterránea, donde las condiciones son reductoras. Otra característica del As, es que en condiciones de pH ácidos las concentraciones encontradas del metaloide disuelto son mayores que aquellas encontradas en aguas con condiciones básicas (Razo *et al.* 2004, Salnikow *et al.* 2008).

Las concentraciones de arsénico en agua se dan de la siguiente manera: en las de origen natural (e.g. lagos y mares), los valores van de 0.001 a 0.002 $\mu\text{g/ml}$; en áreas con actividad volcánica o depósitos de minerales sulfhídricos, las concentraciones se presentan en rangos de hasta 12 $\mu\text{g/ml}$, al igual que en donde existe contaminación por fuentes antropogénicas, como la actividad minera, industrial o agrícola (debido a que algunos de los fertilizantes contienen arsénico), se han reportado concentraciones que van desde 0.5 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$ (ATSDR 2005).

Los desechos mineros son factores importantes para la contaminación de los cuerpos de agua (e.g. la arsenopirita). Sin embargo hay que considerar que la movilidad del arsénico no está determinada por el pH, ya que los intervalos de estos compuestos pueden ir de 1-12, lo que los puede hacer estables una vez en el agua (Razo *et al.* 2004).

A continuación se describen estudios de contaminación de agua por As: Vuyyuri *et al.* (2006) evaluó la contaminación de agua por As de forma industrial en el poblado de Hyderabad, India. El recurso es ocupado para ingesta, usos agrícolas y domésticos. El autor reporta valores que rebasan de 2-200 veces la norma permitida por la EPA (2004) de 0.010 $\mu\text{g/ml}$.

De la misma manera podemos mencionar otros casos con una problemática similar, uno de ellos es Taiwán, donde se han encontrado cantidades en el agua de bebida que rebasan los niveles permitidos (0.17-0.80 $\mu\text{g/ml}$) con intervalos de 0.17-0.80 $\mu\text{g/ml}$ en distintos poblados como Putai , Peimen entre otros(ATSDR 2005).

Chile, es uno más de los países que presenta poblados (Calama, San Pedro de Atacama, Toconao) con elevadas cantidades de Arsénico en agua de bebida que oscilan entre 0.6-0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Martínez 2004). Tondel (1999) encontró altas concentraciones de arsénico (0.01-2.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en el agua de bebida en distintas poblaciones de Bangladesh como Faridpur, Jessore, Narayongong y Nawabgong.

En nuestro país también se registran casos de contaminación por As (siendo importante resaltar que se encuentra dentro de los cuatro primeros países que se dedican a exportar Arsénico al mundo) (ATSDR 2005), aunque la principal causa de contaminación de agua por As en México es ocasionada por fuentes naturales (Blas 1995, Gonsebatt *et al.* 1997, Razo *et al.* 2004)

En cuanto a los múltiples casos que se presentan en México podemos citar el caso de la Comarca Lagunera, Coahuila, donde se encontraron cantidades muy altas de As en agua de bebida (0.420 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que sobrepasan los niveles permitidos por NOM-127-SSA1-1994 que son de 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Blas 1995). En Hermosillo, Sonora, se han encontrado concentraciones de arsénico en cuerpos de agua que sirven para ingesta y usos personales registrando cantidades que rebasan hasta 100 veces la norma mexicana (2.839 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de arsénico en agua) (Peña y García 2006). En Villa de la Paz-Matehuala, San Luis Potosí, de igual manera se encontraron pozos contaminados de uso común por diversos metales, entre ellos el arsénico (4.80-7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Monroy 2002). Aunado a esto, otro estudio en Villa de la Paz reporta valores de arsénico en tanques de almacenamiento de agua de 0.256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rebasando más de 10 veces la norma mexicana (Razo *et al.* 2004, Carrizales *et al.* 2004).

Así, más de dos millones de individuos de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, San Luis Potosí y Morelos se encuentran expuestos a agua contaminada con Arsénico y otros metales (CONAGUA 2005).

1.3. El caso de Huautla, Morelos

Huautla se encuentra en el municipio de Tlaquiltenango dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (decretado como tal en 1999 por la SEMARNAP) (Dorado *et al.* 2005). Ha representado para el municipio, una de las comunidades más importantes debido a la explotación minera (SEMARNAT 2004, Dorado *et al.* 2005).

La minería en la zona de Huautla data aproximadamente de 1580, donde se empezaron a explotar principalmente recursos minerales para la extracción de plata (H. Ayuntamiento Constitucional de Tlaquiltenango Morelos 2003).

En esta región se encuentra la mina “Pájaro Verde”, la cual explotaba yacimientos metalíferos principalmente de plata, zinc, galena, plomo, cobre y oro. Particularmente fue importante por el procesamiento de minerales azufrados de plata y plomo. Esta mina junto con otras presentes en esta región (San Francisco, Plomosa, Ánimas entre otras), produjeron alrededor de 780 mil toneladas de residuos. Los principales contaminantes de estos desechos son el plomo y el arsénico, además de otros materiales no procesados que llevan cadmio, cromo, níquel y manganeso (SEMARNAP 2000).

Actualmente se han detectado dos jales en la zona, los cuales se depositaron en las inmediaciones de las minas, el jal más grande o principal se encuentra localizado a 500 metros del poblado de Huautla y el secundario o más pequeño a un kilómetro (SEMARNAT 2004), con niveles altos de plomo (2297mg/kg), cadmio (10mg/kg) y

arsénico (139mg/kg), estos jales a su vez, se encuentran cerca del cuerpo de agua Arroyo Chico, el cual es utilizado principalmente para la agricultura (H. Ayuntamiento Constitucional de Tlaquiltenango Morelos 2003, SEMARNAT 2004). Cabe destacar que el arsénico y el plomo encontrados en estos jales, se encuentran por arriba de los niveles permitidos por la PROFEPA (1998) (20mg/kg de arsénico en zonas residenciales y 40mg/kg en zonas industriales y para el plomo es de 200mg/kg y 1500mg/kg respectivamente) (SEMARNAT 2004).

Asimismo, los jales se encuentran depositados al aire libre sin las condiciones adecuadas para su manejo y resguardo (SEMARNAT 2004). Por otro lado, dentro de la mina abandonada “Pájaro Verde”, existe un cuerpo de agua que ha servido para abastecer al pueblo con este servicio, el cual, sólo es distribuido por medio de una tubería de la mina a un depósito común, donde es almacenado y distribuido a la mayoría de los pobladores de Huautla (Dorado *et al.* 2005, H. Ayuntamiento Constitucional de Tlaquiltenango Morelos 2003).

1.4. Contaminación de cuerpos de agua por arsénico

Alrededor del todo el mundo se encuentran lugares con distintos cuerpos de agua contaminados por As, los cuales son utilizados para consumo humano, usos personales, riego de sembradíos, entre otros. Afectando a miles de personas, siendo reportadas 50,000,000 de personas en Bangladesh, 1000,000 en la India, 437,000 en Chile y 400,000 en México, entre algunos de los países con mayor incidencia, por lo que actualmente es considerado un problema de salud pública (ATSDR 2005).

En algunos de estos países se han encontrado cantidades de As en agua de bebida que suelen rebasar los niveles permitidos por la EPA (Environmental Protection Agency, 2004) (0.005-0.020 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y la WHO (World Health Organization, 2001) (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En EUA, se han reportado concentraciones de 1.312 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Warner *et al.* 1994), en Bangladesh las concentraciones van de <0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 2.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tondel *et al.* 1999), en Chile se reportaron concentraciones de 0.750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Martínez *et al.* 2004), en la India los valores encontrados son de hasta 247 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Basu *et al.* 2005), en México también se han documentado distintos estados con altas concentraciones de As en agua de bebida, como en la región de la Comarca Lagunera con 0.408 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gonsebatt *et al.* 1997), en Sonora 0.305 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Wyatt *et al.* 1998) Por su parte, en Villa de la Paz-Matehuala, San Luis Potosí se reportan cantidades de 0.265 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de As (Monroy *et al.* 2002), y en Torreón dentro de la región lagunera con 0.027 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de As en agua (Méndez *et al.* 2008), los cuales rebasan los niveles permitidos por la norma mexicana, la cual establece 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (NOM-127-SSA1-1994).

1.5 Efectos a la salud por consumo de agua con arsénico

La ingesta de agua contaminada por As es un problema a nivel mundial, provocando efectos sobre la salud, estos efectos se mencionan a continuación.

Pueden presentarse efectos a nivel gastrointestinal provocando inflamación intestinal, necrosis de la mucosa, hemorragias internas o diarrea con sangre. A nivel cardiovascular se pueden presentar cardiomiopatías que resultan en un shock cardiaco, padecer cambios vasculares que provoquen gangrenas o muertes ocasionadas por

enfermedades cardiovasculares, como la enfermedad vascular periférica (PVD) también llamada enfermedad del pie negro, endémica de la India (Chang *et al.* 2004). Una de las manifestaciones más recurrentes son las lesiones en la piel (cambios de pigmentación en partes del cuerpo sin exposición, hiper e hipopigmentación y queratosis), las cuales se han observado en relación con la dosis ingerida (Tondel *et al.* 1999). También se ha encontrado la enfermedad de Bowen (carcinoma epidermoide) en países como la India (Gosh *et al.* 2006).

Además, puede provocar anemia, fibrosis de hígado, enfermedades pulmonares crónicas, lesiones ulcerativas y gangrena en los dedos de los pies (Basu *et al.* 2004 2005) y ser fuertemente asociado en la formación de diversos cánceres principalmente cáncer de pulmón o de piel (Warner *et al.* 1994).

1.6. Arsénico y genotoxicidad en humanos

Los distintos padecimientos provocados por el arsénico tienen que ver con la capacidad de éste de actuar como agente genotóxico, ya que el arsénico inorgánico es clasificado como clastogénico, debido a que es capaz de producir daños cromosómicos como: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos en distintos tipos celulares (ATSDR 2005).

El arsénico puede estar generando daño al ADN de dos maneras, directa e indirecta.

1.6.1. Daño al ADN de forma indirecta

1.6.1.1. La creación de especies reactivas de oxígeno (EROS), es la principal forma de causar genotoxicidad de forma indirecta, por parte de los metabolitos del As (ácido metil-

arsónico (MMAV), ácido metil-arsenoso (MMAIII), ácido dimetil-arsénico (DMAV) y ácido dimetil-arsenoso (DMAIII)), las cuales van a interactuar con la cadena de DNA provocando rompimiento de las cadenas a través de la oxidación de las bases, por lo que al ser eliminadas las bases dañadas se pueden producir rompimientos del DNA, además de que las EROS son capaces de inhibir enzimas (DNA polimerasa beta (DNA pol β), AP endonucleasa (APE1), poli (ADP ribosa) polimerasa- 1 (PARP)) implicadas en los procesos de reparación generando más daños al DNA (Sykora *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007).

Aunado a esto, se ha demostrado que las especies de arsénico que se encuentran mayormente metiladas (MMAV, DMAV, MMAIII y DMAIII ordenadas de acuerdo al daño provocado al DNA) son más reactivas y tóxicas, ya que estos compuestos son menos estables y fácilmente pueden reaccionar con el oxígeno y generar EROS que posteriormente provoquen el daño al DNA (Andrewes *et al.* 2003).

Las enzimas implicadas en el proceso de reparación por eliminación de bases (BER) es uno de los blancos que ataca el arsénico por medio de EROS, mencionándose a continuación dos de ellas. La DNA polimerasa beta (DNA pol β) es una de las principales enzimas en los procesos de BER, debido a su participación en la síntesis e incorporación de nucleótidos a las cadenas dañadas del DNA, otra enzima de gran importancia es la AP endonucleasa (APE1) por colaborar en la extracción de las bases dañadas, además de funcionar como un factor redox en respuesta a estrés oxidativo, por lo que la generación de EROS afecta la actividad de esta enzima (Sykora *et al.* 2007).

1.6.1.2. La unión de arsénico con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas y enzimas implicadas en los procesos de reparación incluyendo las de BER, es igualmente

importante en la generación de daños al ADN como los provocados por las EROS, debido a que el As presenta una gran afinidad por estos grupos y la elevada presencia de grupos –SH en las proteínas en general, hacen de esta unión un aspecto importante para el daño al DNA (Li *et al.* 1999, Hughes 2006, Yi *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007, Vahter *et al.* 2008).

1.6.1.3. La poli (ADP ribosa) polimerasa-1, es una enzima nuclear que cataliza el ataque covalente de largas cadenas de poli-ADP ribosa con NAD, de gran importancia debido a que facilita la reparación de DNA en respuesta a daño genómico percibido por la enzima. Sin embargo, la sobreexpresión de la PARP altera las reservas de NAD (precursor de ATP) provocando muerte celular por deficiencia energética. El arsénico puede sobreexpresarla y afectarla a través de la generación de EROS, debido a que la activación de PARP, es dependiente de estas moléculas (Kang *et al.* 2004, Park *et al.* 2007). Por otra parte, el arsenito (AsIII) al presentar gran afinidad por grupos sulfhidrilos (también llamados dedos de zinc de las proteínas) adquiere, específicamente, afinidad por la PARP en sus dos dedos de zinc (Cys3, His1) que son utilizados para el reconocimiento de rupturas en las cadenas de DNA, lo que deja una menor actividad de la proteína (Hartwig 2002).

1.6.1.4. El As puede dañar al citoesqueleto, en particular es modificador de microtúbulos al inhibir la actividad enzimática de las tubulinas (alfa y beta), ya que los polímeros de tubulina son inhibidos por la interacción del As con sus grupos sulfhidrilos ocasionando incapacidad para su correcto funcionamiento y ensamblaje de los microtúbulos, además de consumir GTP, necesario para la formación de microtúbulos. El arsénico, específicamente no desestabiliza la tubulina ya formada, sino que inhibe la tubulina libre

que está por formar nuevos microtúbulos, ocasionando que durante el proceso de división mitótica la segregación cromosómica ocurra de una manera errónea y se origine inestabilidad genética (Li *et al.* 1999, Carré *et al.* 2002).

1.6.1.5. Daño en la expresión genética como son XRCC1, MGMT y hMSH2 genes que están implicados en la regulación de los procesos de reparación de rompimientos de cadena simple y reparación por eliminación de bases, ya que estos procesos cumplen la función de corregir los daños ocasionados al DNA por agentes alquilantes y radiación ionizante (Zhang *et al.* 2007).

1.6.2. Daño al DNA de forma directa.

La segunda forma que tiene el arsénico de dañar al DNA es de forma directa.

1.6.2.1. Formación de aductos por la unión al DNA (Bau *et al.* 2002, Kligerman *et al.* 2003). Esto principalmente en el Nitrogeno 7 y Oxígeno 6 de la guanina, además de generar intercalación con el DNA, intercruzamientos (unión con ambas cadenas) o intracruzamientos (unión en un punto de la cadena) que provocan una modificación estérica para la síntesis del DNA (Mussali 2001).

1.6.2.2. Alquilación del DNA al formar enlaces covalentes entre los grupos alquilo del arsénico y las bases nitrogenadas de éste (Florez *et al.* 1997).

1.7. Pruebas de genotoxicidad

Los daños mencionados anteriormente por parte del As que se generan en el ADN pueden ser evaluados por distintas técnicas para medir genotoxicidad.

1.7.1. *Prueba de Ames*. Se basa en la utilización de cepas mutantes de la bacteria *Salmonella typhimurium*. Esta cepa es incapaz de sintetizar histidina por sí misma, por lo que necesita de un medio de cultivo con este aminoácido. Los agentes químicos administrados son capaces de provocar mutaciones que permitan el sintetizar “de novo” histidina y crecer. Mostrando a mayor cantidad de colonias un mayor potencial mutagénico del agente químico (Sherman *et al.* 1992, OECD 2005)

1.7.2. *Aberraciones cromosómicas*. Es una técnica capaz de revelar daño citogenético a causa de un agente químico o radiaciones ionizantes por medio de la identificación de cambios estructurales o numéricos en los cromosomas (Arboleda *et al.* 2004, OECD 2005). Es ampliamente utilizada para el estudio de poblaciones expuestas a agentes genotóxicos que puedan causar mutaciones. Es ampliamente recomendada por asociaciones como la Environmental Protection Agency (EPA) para biomonitoreo de poblaciones humanas (Arboleda *et al.* 2004).

1.7.3. *Intercambio de cromátidas hermanas*. Esta técnica es capaz de detectar rompimientos, re-uniones de ambas cadenas del ADN en las cromátidas hermanas como resultado del daño ocasionado por agentes químicos como metales. Al igual que las técnicas anteriores, es un biomarcador sensible a agentes químicos genotóxicos y biomonitoreo de poblaciones humanas (EPA 1996).

1.7.4. *Electroforesis de células únicas en gel*. Es una herramienta en estudios de reparación de DNA, biomonitoreo de poblaciones y pruebas de genotoxicidad a partir de daños provocados por agentes químicos o radiación (Olive y Banáth 1993, Ross *et al.* 1995, Mussali *et al.* 2005). Permite detectar rompimiento de doble cadena del DNA o en

el caso de condiciones alcalinas se pueden detectar rompimientos de cadena sencilla y sitios sensibles al alcali (Wojewódzka *et al.* 2002, Razo *et al.* 2004, Mussali *et al.* 2005).

1.7.5. Técnica de micronúcleos. Es ampliamente utilizada para pruebas de genotoxicidad y actualmente ha cobrado un gran auge debido a su sensibilidad para detectar sustancias clastógenas. Es recomendada por organizaciones como la EPA 1998, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD 1997) y la Food and Drug Administration (FDA) 2000 para evaluar genotoxicidad, y biomonitoreo en humanos expuestos a factores químicos o físicos de manera natural u ocupacional; los micronúcleos pueden ser contabilizados con facilidad y los tipos celulares utilizados para detectar el daño cromosómico son variados, tales como linfocitos, fibroblastos y epitelios como el oral, nasal o urotelial (Guzmán 1997, Kirsch-Volders 2001, Pastor *et al.* 2002, Montero *et al.* 2003, Çelik y Kanik 2006). La técnica ayuda en la discriminación si el daño es ocasionado por un agente clastógeno o aneugeno debido a que puede mostrar si un micronúcleo contiene un cromosoma entero o una porción del cromosoma, de ser lo primero se debe a un agente clastógeno y el segundo a uno aneugénico (Kirsch-Volders 2001).

Los Micronúcleos son causados por agentes químicos o físicos, la formación de estos es el resultado de la fragmentación cromosómica, éste puede contener una porción del cromosoma o un cromosoma entero, se forma durante la división celular en anafase, esto provoca una disfunción en el proceso de segregación cromosómica, ya sea por el mal funcionamiento de huso mitótico, la ruptura de las cadenas de DNA o al no poder ser reparados aquellos daños en el ADN, llevando a la formación de un micronúcleo. Esta

porción de ADN va a ser excluida del núcleo principal y liberada en el citoplasma, rodeada de una membrana y localizado en las proximidades del núcleo (Warner *et al.* 1994, Çelik *et al.* 2006, Yi *et al.* 2007).

Por otra parte, se sugiere que la formación puede ocurrir tanto fase S o M (Síntesis o Mitosis) del ciclo celular, ya que durante la fase de síntesis, la célula empieza a sintetizar toda una gama de proteínas que le servirán en las fases siguientes así como a duplicar su material genético, esta duplicación se puede dar de manera incorrecta resultando en una amplificación génica causando un exceso de material que debe ser eliminado, estas porciones serán liberadas al citoplasma a partir de la formación de una yema nuclear y finalmente un micronúcleo (Lindberg *et al.* 2007).

1.8. Micronúcleos y cambios nucleares en células del epitelio bucal.

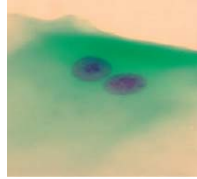

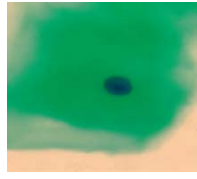

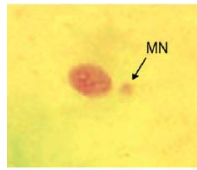
Una de las células más utilizadas para evaluar micronúcleos son: linfocitos de sangre periférica, células descamadas de epitelio bucal o urotelial. Las células del epitelio bucal fueron utilizadas en nuestro estudio ya que presentan las siguientes ventajas:

El epitelio bucal, es un tejido a estudiar ya que evidencia los daños provocados en la capa basal, que migran hacia la capa superficial, estos cambios son rápidamente observados gracias a su recambio celular mencionado, por lo tanto, a diferencia de otros epitelios, el bucal no necesita de estimulantes mitóticos para revelar los daños ocasionados al ADN, aunado a que más del 92% de los cánceres son de origen epitelial y finalmente por ser el primer órgano en contacto con agentes químicos por la vía oral (Vargas *et al.* 1995, Çelik *et al.* 2003).

Las características histológicas que presentan son: un epitelio de revestimiento que se encuentra en la cavidad bucal localizado principalmente en el paladar blando, el piso de la boca y las mejillas, es plano estratificado no queratinizado conteniendo 3 capas principales, el estrato basal (con células poliédricas y un núcleo esférico muy grande), intermedio (con células de tipo poliédricas y cilíndricas con un núcleo de menor medida) y superior (células aplanadas con un núcleo alargado llegando a encontrarse en la parte más superficial células sin núcleo ya muertas). Durante su formación, las células germinativas que se encuentran en el estrato basal, se van diferenciando y proliferando, para posteriormente avanzar a los estratos superiores e ir remplazando a las células muertas. Este recambio es de rápida duración y se da aproximadamente en 25 días (Guzmán 1997, Estrada *et al.* 2002).

Aunado a la técnica de micronúcleos, se pueden analizar distintos cambios nucleares que se presentan como respuesta a una alteración citotóxica o genotóxica provocadas por la exposición oral a metales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cambios nucleares en células de epitelio bucal. Modificado de Thomas *et al.* 2007.

CAMBIO NUCLEAR	DEFINICIÓN	IMAGEN
Binucleación	Presentan dos núcleos por célula y se encuentran cercanos. Ambas células tienen morfología igual	
Cariorrexis	Estas células se caracterizan por una agregación de cromatina, conduciendo a la fragmentación del núcleo.	
Picnosis	Son células con el núcleo contraído, alta densidad del material nuclear y suelen estar muy teñidos	
Yema nuclear	El núcleo presenta una constricción en un extremo. Se forma un brote nuclear muy cercano al núcleo y conectados. Con las mismas propiedades tintoriales.	
Micronúcleo	Presentan un núcleo principal y uno o más núcleos pequeños productos del fraccionamiento cromosómico.	

Estos cambios pueden ser por efectos citotóxicos, encontrando, de manera progresiva, células en kariorrhexis y picnosis, así como la aparición de células binucleadas; los dos primeros cambios son propios de necrosis, donde ocurren en procesos de pre-queratinización que representan respuestas a daños celulares, que pueden ir desde la

masticación diaria de alimentos, hasta exposiciones a agentes químicos. En el caso de cambios nucleares formados por efectos genotóxicos encontramos a la formación de yemas nucleares y a los micronúcleos. Las yemas nucleares pueden ser consideradas como un estadio anterior a los micronúcleos, aunque esta fase puede permanecer así sin la necesaria formación del micronúcleo (Ramírez *et al.* 2002).

1.9. Antecedentes

1.9.1. Exposición oral a arsénico y efectos a la salud

La ingesta de agua contaminada por As en poblaciones humanas puede provocar diversos efectos sobre la salud, como son daños a nivel gastrointestinal, cardiopatías, anemias, fibrosis de hígado, problemas de piel (e.g., queratosis) y desarrollar cáncer de pulmón o piel, entre otros. Asimismo, en diversas partes del mundo se han reportado casos de hidroarsenismo, los cuales representan una problemática en la salud humana. Algunos de estos casos se mencionan a continuación.

1.9.1.1. Estudios a nivel internacional

Warner *et al.* (1994), analizaron un poblado de Nevada, EUA con el propósito de evaluar los posibles daños genotóxicos por el As asociados a la frecuencia de micronúcleos en epitelios como son el bucal y de vejiga en dos grupos de pobladores (18 personas por grupo). Uno de los grupos se encontraba expuesto a agua contaminada con As con valores de 1.312µg/ml, mientras que el grupo testigo registró valores de 0.016µg/ml. El estudio mostró una mayor frecuencia de micronúcleos en el epitelio de vejiga de los individuos expuestos (2.79MN/1000 células) con respecto a los testigos (1.57MN/1000

células), indicando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y para el caso del epitelio bucal no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos estudiados. Los autores sugieren que el incremento en el daño genotóxico en el epitelio de vejiga se debe a la ingesta crónica de agua con As y en contraste con esto, las frecuencias de micronúcleos en epitelio bucal no revelan una relación con la ingesta crónica, lo anterior sugiere un posible desarrollo de cáncer de vejiga en aquellas personas expuestas al agua contaminada con As.

Tondel *et al.* (1999) realizaron un estudio en Bangladesh con el propósito de determinar la relación entre las dosis de agua ingerida con arsénico y los problemas de salud ocasionados por esta exposición. En total se examinaron a 1,481 personas residentes de cuatro villas (Faridpur, Jessore, Narayongong y Nawabgong). En general, las muestras de agua recolectadas en los cuatro distritos, mostraron distintas concentraciones de As en intervalos de 0.01 μ g/ml a 2.04 μ g/ml. Del total de personas expuestas, el 29% manifestaron lesiones en la piel (cambios de pigmentación en partes del cuerpo sin exposición, hiper e hipopigmentación, queratosis). Los autores concluyeron que hay una relación entre dosis ingerida y la prevalencia de lesiones de piel por arsénico.

Por su parte, Martínez *et al.* (2004) realizaron un estudio en la localidad de Antofagasta al norte de Chile, con el propósito de aportar información sobre el posible riesgo genotóxico asociado a la ingesta de agua con As. En total, se evaluaron a 216 personas, de las cuales 106 eran residentes de Antofagasta (grupo expuesto) y 111 de Concepción como grupo testigo, reportando valores de 0.750 μ g/ml de As en el agua de

bebida de las personas expuestas, y 0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el grupo testigo. Se aplicó la técnica de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, para revelar el posible daño genotóxico provocado por el As. Se registraron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos entre el grupo expuesto y testigo, siendo mayor en los individuos expuestos (14.4 MN/1000 células) que en los testigos (11.9 MN/1000 células). Los autores concluyen que los resultados reportados muestran un riesgo genotóxico asociado a la exposición a arsénico, el cual es modulado por las diferencias metabólicas en las personas que consumen este recurso.

Por otro lado, Basu *et al.* (2004) realizaron un estudio en cuatro poblados pertenecientes al distrito de Parganas (Gaighata, Habra, Deganga, Baduria), al oeste de Bengal, India, con el objetivo de evaluar y comparar las frecuencias de micronúcleos en distintos tipos celulares de personas residentes con problemas de hidroarsenismo. Se tomaron para el estudio 163 pobladores, donde se reportaron concentraciones de As en agua de 0.214 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en comparación con las cantidades reportadas del poblado de Contai localizado al este de Midnapur, el cual presenta intervalos de As en agua de 0.007-0.009 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se tomaron muestras de linfocitos de sangre periférica, epitelio bucal y urotelial para medir la frecuencia de micronúcleos en ambos grupos, reportando en linfocitos 9.34 MN/1000células en los expuestos y 1.66 MN/1000 células en los testigos; en las células de mucosa 5.94 MN/1000 células en los expuestos y 1.28 MN/1000 células en los testigos; y finalmente para las células uroteliales encontraron 6.65 MN/1000 células en los expuestos y 1.41 MN/1000 células en los testigos. Concluyendo los autores que los individuos expuestos al agua con altos niveles de arsénico, presentan mayor frecuencia de micronúcleos que los del grupo testigo en todos los tipos celulares

analizados y haber diferencias estadísticamente significativas, además de manifestar problemas en la piel, anemia, fibrosis de hígado, enfermedades pulmonares crónicas, lesiones ulcerativas y gangrena en los dedos de los pies.

De igual forma, Gosh *et al.* (2006) estudiaron a los pobladores de Parganas y Nadia en Bengal, India, para evaluar los daños ocasionados por el As y determinar las diferencias genéticas entre individuos expuestos a este recurso que muestran síntomas. Para el estudio se analizaron 422 personas expuestas a arsénico en agua de bebida, dividiendo en dos grupos a los individuos, 244 sintomáticos y 178 asintomáticos. Los datos obtenidos de las muestras de agua muestran cantidades de $0.246\mu\text{g/ml}$ en el grupo de personas sintomáticas, $0.202\mu\text{g/ml}$ en las personas asintomáticas y $0.007\mu\text{g/ml}$ en el grupo testigo. Los efectos del consumo de esta agua se analizaron con la técnica de aberraciones cromosómicas en linfocitos y micronúcleos en epitelio bucal, urotelial y linfocitos. Observando que de los tres tipos celulares, los linfocitos presentaban una mayor frecuencia de micronúcleos que los otros dos ($9.13 \text{ MN}/1000\text{cel}$, $5.62 \text{ MN}/1000\text{cel}$, $6.01 \text{ MN}/1000\text{cel}$, para linfocitos, epitelio bucal, células uroteliales respectivamente) y estos a su vez una frecuencia mayor que los individuos controles. Con respecto al ensayo de aberraciones cromosómicas los individuos expuestos presentaron un frecuencia mayor que los testigos ($0.092 \text{ AC}/\text{cel}$ y $0.024 \text{ AC}/\text{cel}$ respectivamente). Como conclusión, los autores mencionan que las personas sintomáticas presentan mayor daño genotóxico que las personas asintomáticas, sin embargo estas personas son igualmente afectadas por el arsénico y susceptibles a daños genotóxicos. Así como la importancia que representan las variaciones génicas para tolerar los daños provocados por el As.

1.9.1.2. Estudios realizados en poblaciones mexicanas.

Blas (1995) analizó el agua de bebida de los poblados de Santa Ana y Nazareno, Coahuila, para evaluar los daños genotóxicos provocados por el As en muestras de epitelio bucal de individuos expuestos a agua contaminada por este metaloide. Se tomaron para el estudio 61 pobladores, 30 de Santa Ana como grupo expuesto y 31 de Nazareno como testigos, donde encontró cantidades de arsénico en el agua de 0.420 $\mu\text{g/ml}$ en el poblado expuesto y 0.037 $\mu\text{g/ml}$ en el poblado testigo. Se tomaron muestras de células epiteliales de vejiga y se analizaron por medio de la técnica de micronúcleos. Encontrando 2.22 MN/2500 células en los expuestos y 0.48 MN/2500 células en los testigos. La autora concluye que los pobladores de Santa Ana presentan un mayor daño genotóxico en las células epiteliales de vejiga que las personas del grupo testigo, como consecuencia de la ingesta crónica del agua contaminada por As, además de padecer posteriormente alguna enfermedad asociada al As o desarrollar algún tipo de cáncer.

Por su parte Gonsebatt *et al.* (1997), realizaron un estudio en el poblado de Santa Ana, Coahuila, con el objetivo de evaluar el daño genotóxico inducido por el As contenido en el agua de bebida en distintos tipos celulares (bucal, vejiga y linfocitos) con el uso de micronúcleos y aberraciones. En el estudio participaron 65 individuos (30 expuestos y 35 testigos), y se reportaron cantidades de As de 0.408 $\mu\text{g/ml}$ en el agua de bebida de la población expuesta y en la población testigo (Nazareno) se reportaron cantidades de 0.029 $\mu\text{g/ml}$. En general los autores reportan, en el epitelio bucal la frecuencia 2.21 MN/1000 células en el grupo expuesto y 0.56 MN/1000 células en el testigo; en el epitelio urotelial 2.22 MN/1000 células en personas expuestas y 0.48 MN/1000 células en los testigos. Para el caso de las aberraciones cromosómicas se

encontraron 7.12% aberraciones en los expuestos contra 2.96% de los testigos. Concluyendo los autores que la ingesta de altas concentraciones de As, ocasiona daños clastogénicos y aneugénicos en los tipos celulares analizados, además de mencionar que las células epiteliales al estar en contacto directo con el agente carcinógeno, presentan un incremento en MN estadísticamente significativo, principalmente las de origen urotelial, debido a que se encuentra en contacto tanto con especies inorgánicas y metiladas del As y las del epitelio bucal solo con las inorgánicas.

II. JUSTIFICACIÓN

Los metales son una fuente importante de contaminación de los recursos naturales en el mundo y en México, ya sea de forma natural o industrial. A pesar de ello y de que la contaminación por metales en el agua de bebida es considerada como un problema de salud pública en nuestro país, no hay estudios que evalúen la concentración de metales en el agua de bebida y sus posibles efectos en la salud de los pobladores de Huautla, Morelos, aunado a que este sitio fue decretado como “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” y patrimonio de la humanidad (UNESCO 2006). Por lo que es importante llevar a cabo este estudio para que en caso de que la población esté afectada reciba la información y atención necesarias además de señalar un posible problema a nivel ambiental y salud que deba ser tomado en cuenta.

III. OBJETIVOS

General

- Medir la concentración de metales en agua de bebida y en sangre periférica tanto de la población expuesta (Huautila, Morelos) como de la población control (Ajuchitlán, Morelos). Así como evaluar los cambios nucleares en el epitelio bucal de ambas poblaciones.

Particulares

- Analizar las concentraciones de metales en agua de bebida por medio de espectro fotometría de absorción atómica.
- Analizar las concentraciones de metales en sangre periférica de los pobladores de la población expuesta y control por medio de la técnica de espectro fotometría de absorción atómica .
- Evaluar las frecuencias de micronúcleos y cambios nucleares por medio de la técnica de micronúcleos en el epitelio bucal tanto de los pobladores de la población expuesta como de la población control.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Población expuesta: Huautla, Morelos

La zona de estudio se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla que está ubicada al sur del estado de Morelos con una cobertura de 59 mil ha y con una altura de los 700 a 2200 m s.n.m., clima semicálido subtropical. Presenta una población total aproximada de 1500 personas siendo los hombres la mayoría y localizada dentro del Municipio de Tlaquiltenango.

En el poblado se encuentran varios jales. El principal se encuentra a medio kilómetro del poblado con una altura de 70m, largo de 180m y ancho de 80m. Un jal secundario se encuentra a 1km del poblado.

El agua que se consume en Huautla, como se mencionó con anterioridad, es proveniente de un cuerpo de agua dentro de la mina abandonada “pájaro verde”. Ésta ha sido utilizada para abastecer a la mayoría de la comunidad por medio de una tubería que va desde la mina hasta un depósito para su almacenamiento sin un tratamiento previo y consumo (Dorado 2005, H. Ayuntamiento Constitucional de Tlalquintenango Morelos 2003) (Fig 1).

4.2. Población control: Ajuchitlan, Morelos

Se encuentra dentro del municipio de Tlaquiltenango, su clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano y sujeta a la conservación ecológica de la sierra de Huautla. Su población consiste de aproximadamente 500 personas (IMTA 2006). El estilo de vida y condiciones socioeconómicas son similares a la población expuesta, aunado a esto los afluentes de agua son totalmente independientes a los de Huautla, por lo que se eligió como población control (IMTA 2006) (Fig. 1).

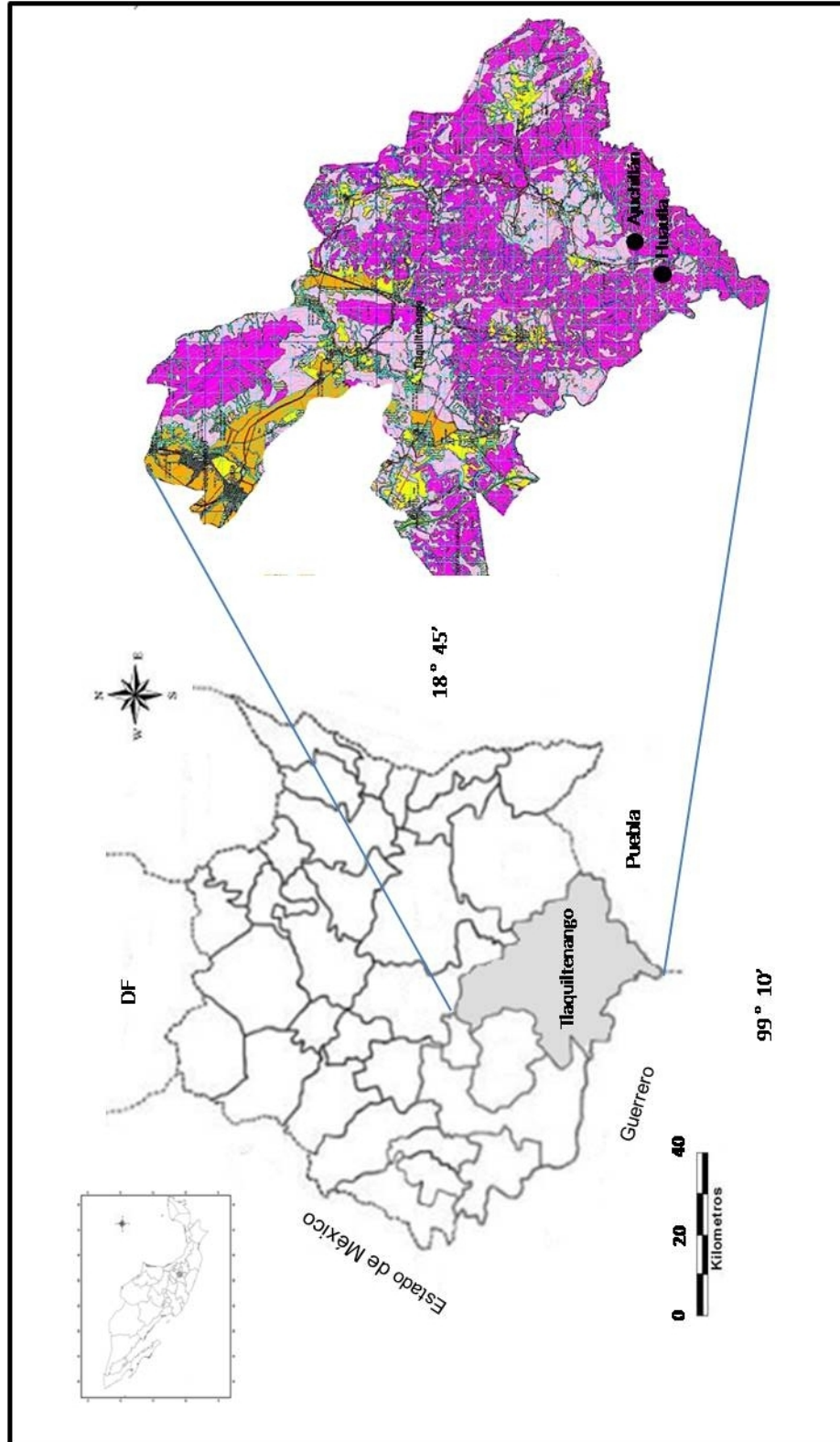


Figura 1. Se muestran las dos poblaciones de estudio, Huautla (expuesto) y Ajuchitlán (control). Tomado de: H. Ayuntamiento Constitucional de Tlalquitenango Morelos.

4.3. Hoja de consentimiento informado

Se elaboró una hoja de consentimiento informado para la realización del estudio tanto en el poblado de Huautla, como en Ajuchitlán con el fin de comunicar y proteger a los pobladores sobre el procedimiento del estudio, sus posibles riesgos y beneficios para finalmente proceder de manera voluntaria.

4.4. Cuestionario

Se hicieron 71 cuestionarios en Huautla y 30 en Ajuchitlán, de los cuales se eligieron 22 personas de la población expuesta y 11 de la población control; los aspectos que abarcó el cuestionario fueron los siguientes:

Edad, estado civil, alimentación, historia clínica, ocupación (pasada y presente), consumo de alcohol y/o tabaco, tipo de agua consumida, exposición a agentes químicos, exposición a plaguicidas, tipo de plaguicidas, uso de medicamentos, entre otros.

4.5. Criterios de inclusión.

Cuadro 2. Criterios de inclusión

Población control: Ajuchitlan	Población expuesta: Huautla
• 11 hombres	• 22 hombres
• 20- 50 años de edad	• 20- 50 años de edad
• beban agua de los 3 pozos de donde se tomaron las muestras	• beban agua de la mina “pájaro verde”
• 10 o más años de residencia en el lugar	• 10 o más años de residencia en el lugar
• bajo ningún tratamiento médico	• bajo ningún tratamiento médico

4.6. Toma de muestras de sangre

Se tomó una muestra por cada donador (expuestos y controles) de aproximadamente 5ml de sangre entera en tubos vacutainer, posteriormente se pusieron en un recipiente con hielo y se transportaron al laboratorio para la medición de metales por medio de espectrofotometría de absorción atómica en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

4.7. Toma de muestras de agua

Se tomaron un total de 36 muestras en el poblado de Huautla. Tres muestras de agua en la mina y 3 del depósito en tres días diferentes durante la época de sequía y esta misma cantidad de muestras en época de lluvias siendo 9 muestras de la mina y 9 del depósito, por temporada. Posteriormente se recolectaron 54 muestras de Ajuchitlán de 3 distintos pozos por cada pozo se tomaron 3 muestras por tres días en la temporada de sequía, dando 27 muestras en sequía y 27 en temporada de lluvias. Las muestras se recolectaron en frascos de plástico lavados con anterioridad con una mezcla de agua y HNO_3 suprapuro. A cada muestra se le midió la temperatura y el pH, se colocaron en una hielera y se transportaron al laboratorio para ser analizadas por espectrofotometría de absorción atómica en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

4.8. Tomas de muestras de epitelio bucal

Los donadores se enjuagaron la boca; se les realizaron dos raspados, uno por cada mejilla con un portaobjetos previamente lavado, por cada portaobjetos se realizó un frotis para obtener 4 muestras por donador siendo 22 individuos expuestos y 11 controles.

4.9. Análisis de Micronúcleos y cambios nucleares en el epitelio bucal

4.9.1. Preparación de las muestras

Las muestras se fijaron con metanol al 80% durante 24 horas en vasos de Kopplin a 4°C. Se dejaron hasta secar al aire libre. Se tiñeron con 5ml de colorante de Giemsa, durante 5 minutos, se enjuagaron varias veces con agua corriente quitando el exceso de colorante para finalmente dejarlas secarse al aire.

4.9.2. Evaluación microscópica

Para el análisis microscópico se utilizó un microscopio óptico con un lente ocular de 10 aumentos y un objetivo de 40 aumentos. En casos donde fuera necesario una mejor apreciación para la discriminación se utilizó el objetivo de 100 aumentos.

Cada uno de los casos se analizó siguiendo los siguientes criterios:

- ⇒ Micronúcleos: de 1/5 a 1/16 del núcleo principal, no refringentes, tinción y forma similar al núcleo principal.
- ⇒ Cariolisis: disolución total del núcleo dejando una silueta de la posición en donde se encontraba.
- ⇒ Cariorrexis: rompimiento del núcleo en varios trozos.
- ⇒ Binucleación: dos núcleos idénticos dentro de una célula.
- ⇒ Picnosis: presentar una tinción más oscura y tamaño más pequeño del núcleo.
- ⇒ Yemas nucleares: cuerpo micronuclear unido por una conexión nucleoplásmica con el núcleo principal.

Durante el análisis se contabilizaron 2000 células por cada individuo en ambos grupos estudiados.

4.9.3. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANDeVA) de una vía para evaluar el efecto del As en la población expuesta sobre la inducción en diferentes cambios nucleares (células binucleadas, yemas nucleares, picnosis y micronúcleos). Los datos en porcentaje fueron transformados con $\arcsen\sqrt{\%}$ para que los datos presenten una distribución normal y homocedasticidad (Zar, 1999). Asimismo, se realizó estadística descriptiva.

V. RESULTADOS

5.1. Presencia de metales en muestras de agua de la población expuesta y control.

Los resultados obtenidos de las muestras tomadas en el depósito de agua del poblado de Huautla revelan que las cantidades de plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), y cadmio (Cd) no rebasan los límites permisibles por la NOM-127-SSA1-1994 la cual establece que los límites son $0.01\mu\text{g/ml}$, $2\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$ y $0.005\mu\text{g/ml}$ para cada metal respectivamente y en ambos periodos de recolecta (secas y lluvia). Por el contrario para el caso del arsénico los valores muestran que en temporada de sequía, en el agua había una concentración de $0.240\mu\text{g/ml}$ y en la época de lluvias los niveles encontrados eran de $0.244\mu\text{g/ml}$ rebasando en ambos casos hasta por 10 veces el nivel permitido por la norma mexicana ($0.025\mu\text{g/ml}$) (Cuadro 3).

De las muestras de agua tomadas de la mina abandonada, se encontraron que al igual que en el caso del depósito, las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Cd no rebasan ninguno de los niveles máximos permitidos por la norma mexicana, pero el arsénico rebasa hasta 9 veces el valor de la norma al encontrar $0.222\mu\text{g/ml}$ en el agua de la temporada de sequía y $0.242\mu\text{g/ml}$ en la de lluvia (Cuadro 4).

Con respecto al poblado control, las muestras analizadas en ambas temporadas de recolecta, no revelan cantidades de ninguno de los metales analizados que sobrepasen los niveles máximos permitidos (Cuadro 5 y 6).

Cuadro 3. Concentraciones de metales en muestras de agua tomadas del depósito del pueblo de Huautla. Promedio \pm desviación estándar de nueve muestras por temporada ($\mu\text{g/ml}$).

	Pb	As	Cu	Zn	Cd
Límite permisible	0.01	0.025	2	5	0.005
Temporada de sequía X \pm d.e.	ND	0.240 \pm 0.009	ND	0.05 \pm 0.010	ND
Temporada de lluvia X \pm d.e.	ND	0.244 \pm 0.004	ND	0.03 \pm 0.00	ND

ND: no detectable

Cuadro 4. Concentraciones de metales en muestras de agua tomadas de la mina del pueblo de Huautla. Promedio \pm desviación estándar de nueve muestras por temporada ($\mu\text{g/ml}$).

	Pb	As	Cu	Zn	Cd
Límite permisible	0.01	0.025	2	5	0.005
Temporada de sequía X \pm d.e.	ND	0.222 \pm 0.005	ND	0.03 \pm 0.007	ND
Temporada de lluvia X \pm d.e.	0.007 \pm 0.001	0.242 \pm 0.066	ND	0.01 \pm 0.006	ND

ND: no detectable

Cuadro 5. Concentraciones de metales en muestras de agua obtenidas del pueblo de Ajuchitlán en temporada de sequía. Promedio \pm desviación estándar de 27 de muestras ($\mu\text{g/ml}$).

	Pb	As	Cu	Zn	Cd
Límite permisible	0.01	0.025	2	5	0.005
Pozo1 X \pm d.e.	ND	ND	ND	0.07 \pm 0.21	ND
Pozo2 X \pm d.e.	ND	ND	ND	0.03 \pm 0.012	ND
Pozo3 X \pm d.e.	ND	ND	ND	0.05 \pm 0.002	ND

ND: no detectable

Cuadro 6. Concentraciones de metales en muestras de agua obtenidas del pueblo de Ajuchitlán en temporada de lluvias. Promedio \pm desviación estándar de 27 de muestras ($\mu\text{g/ml}$).

	Pb	As	Cu	Zn	Cd
Límite permisible	0.01	0.025	2	5	0.005
Pozo1 X \pm d.e.	ND	ND	ND	0.10 \pm 0.015	ND
Pozo2 X \pm d.e.	ND	ND	ND	0.03 \pm 0.01	ND
Pozo3 X \pm d.e.	ND	ND	ND	0.02 \pm 0.008	ND

ND: no detectable

5.2. Análisis de las muestras de sangre

Las muestras de sangre tomadas a los 22 pobladores de Huautla tuvieron un promedio para el caso del Arsénico de 0.058 $\mu\text{g/ml}$ lo que rebasa 8 veces los niveles permitidos por la ATSDR (2000) de 0.007 $\mu\text{g/ml}$ y 0.004 $\mu\text{g/ml}$ reportados por Ryan *et al.* (2000), mientras que para los casos de Pb, Cu, Zn y Cd, las cantidades encontradas fueron de 7.86 $\mu\text{g/dl}$, 0.872 $\mu\text{g/ml}$, 6.418 $\mu\text{g/ml}$, <0.003 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, las cuales se encuentran por debajo de los niveles permitidos 10 $\mu\text{g/dl}$, 1.6 $\mu\text{g/ml}$, 1.6 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$, 0.003 $\mu\text{g/ml}$ para cada caso respectivamente (West Midlands Toxicology Laboratory 2005) (Cuadro 7). Otros datos revelan límites permisibles de 10 $\mu\text{g/dl}$ para Pb (American Conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs 2008), 2.2 $\mu\text{g/ml}$ para Cu (Ryan y Terry 1997). 12 $\mu\text{g/ml}$ para Zn (Ryan y Terry 1997) y 0.005 $\mu\text{g/ml}$ para Cd (American Conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs 2008). De la población de Ajuchitlán, los resultados obtenidos no muestran ningún valor que rebase los límites permitidos (Cuadro 8).

Tabla 7. Concentraciones de metales en muestras de sangre tomadas de los pobladores de Huautla. Promedio \pm desviación estándar de 22 de muestras ($\mu\text{g/ml}$).

	Pb	As	Cu	Zn	Cd
Límite permisible	10	0.007	0.7-1.6	6-7	0.003
X \pm d.e.	7.86 \pm 3.94	0.058 \pm 3.94	0.872 \pm 0.13	6.418 \pm 1.43	ND

ND: no detectable

Tabla 8. Concentraciones de metales en muestras de sangre tomadas de los pobladores de Ajuchitlán. Promedio \pm desviación estándar de 11 de muestras ($\mu\text{g/ml}$).

	Pb	As	Cu	Zn	Cd
Límite permisible	10	0.007	0.7-1.6	6-7	0.003
X \pm d.e.	0.115 \pm 0.04	ND	1.185 \pm 0.14	7.042 \pm 1	0.002

ND: no detectable

5.3. Análisis de los cambios nucleares en las muestras de epitelio bucal

De todos los cambios analizados, las células binucleadas, yemas nucleares, picnosis y MN mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y expuesto ($F_{1,62}=6.99$ $P<0.01$) ($F_{1,62}=11.52$ $P<0.001$) ($F_{1,62}=7.14$ $P<0.01$) ($F_{1,62}=5.56$ $P<0.05$) respectivamente (Figs. 4b, 5b, 6a y 6b). Para el caso de las células sin daño, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos, mostrando un porcentaje de 80% de células sin ningún tipo de daño (Fig. 4a). Asimismo, las células con cariorrexis no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($F_{1,62}=0.01$ $P<0.05$) (Fig. 5a, 2 y 3).

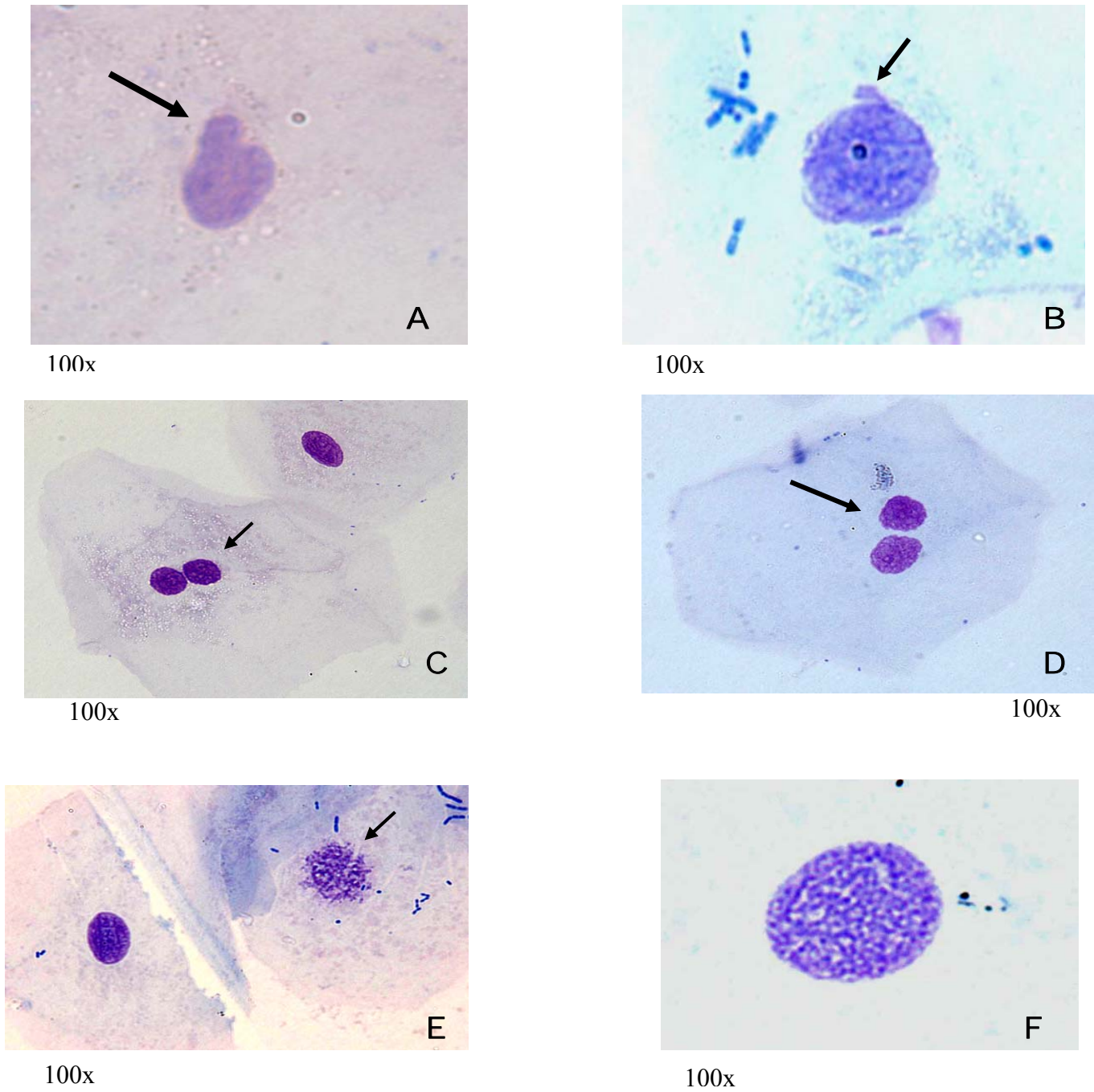
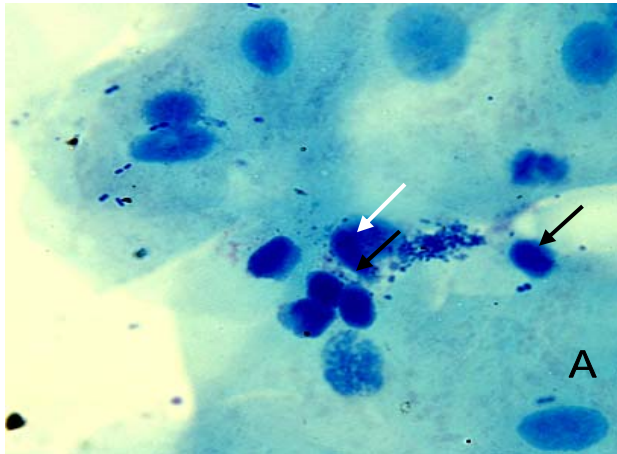
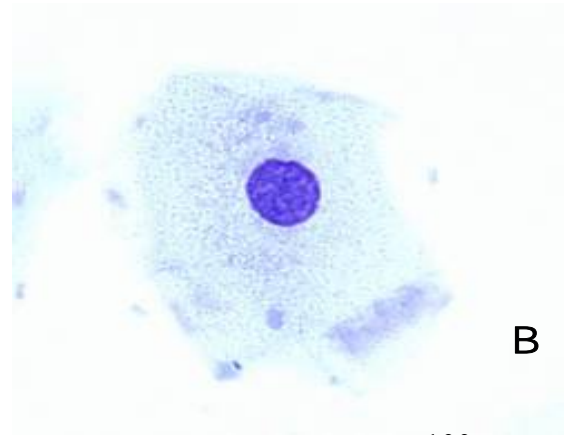


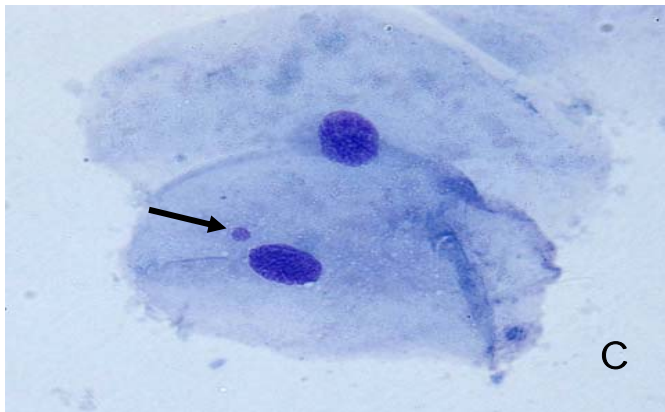
Figura 2 a y b) células que presentan yemas nucleares indicadas por las flechas. c y d) células binucleadas indicadas por las flechas. e) célula con cariorrexis indicada por la flecha. f) acercamiento de célula con cariorrexis.



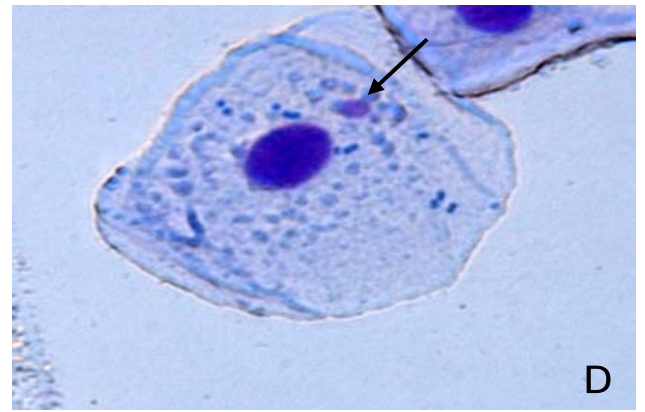
100x



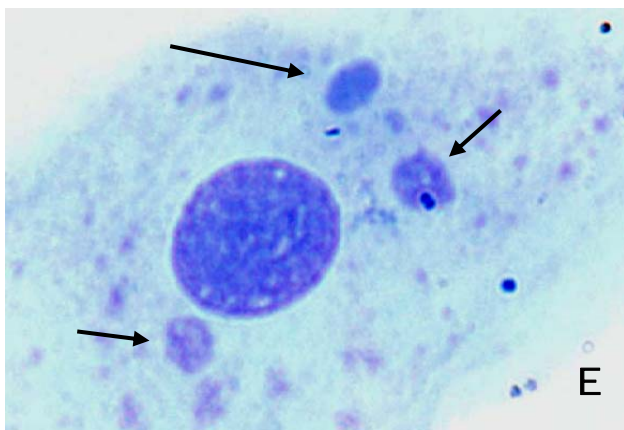
100x



100x



100x



100x



100x

Figura 3. a) Múltiples células picnóticas indicadas por las flechas. b) célula de un individuo control. c y d) células con micronúcleos indicados por las flechas. e) célula con tres micronúcleos alrededor del núcleo principal indicados por las flechas. f) célula binucleada con presencia de un micronúcleo indicado por la flecha.

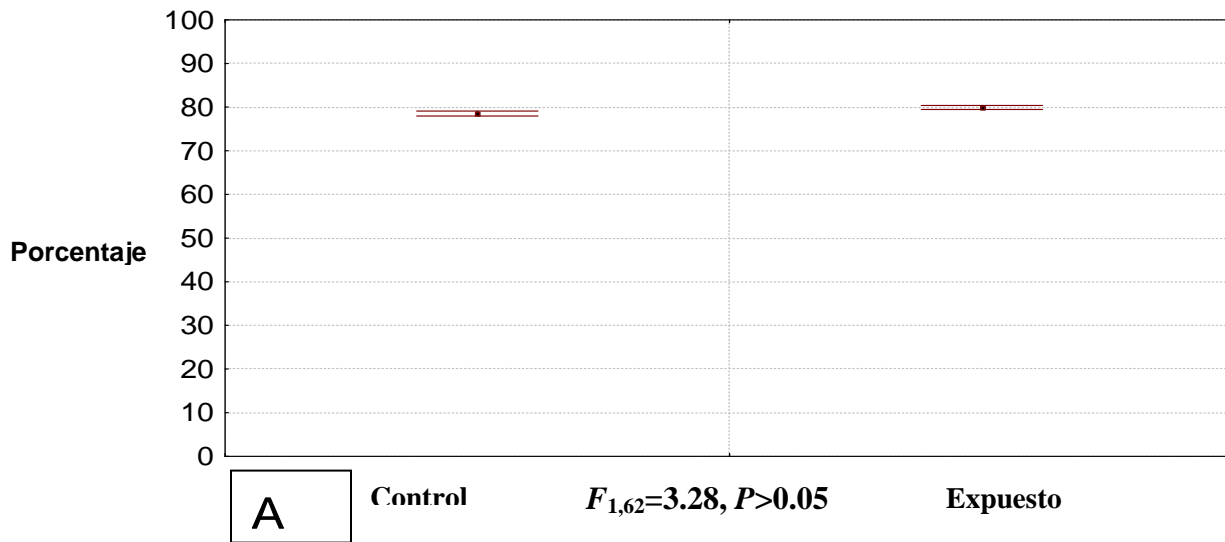
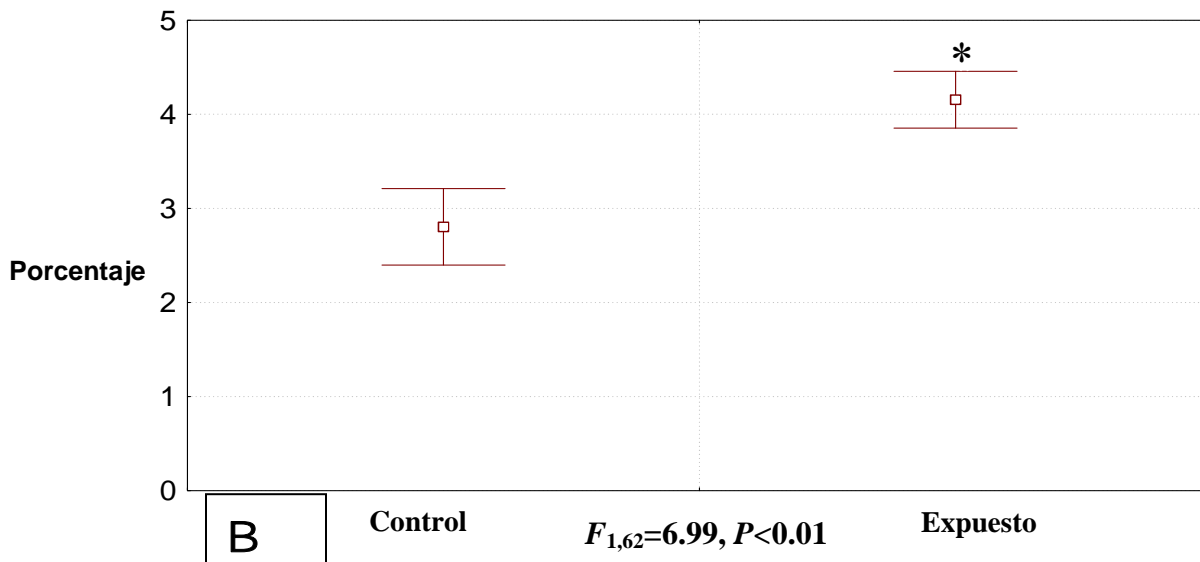
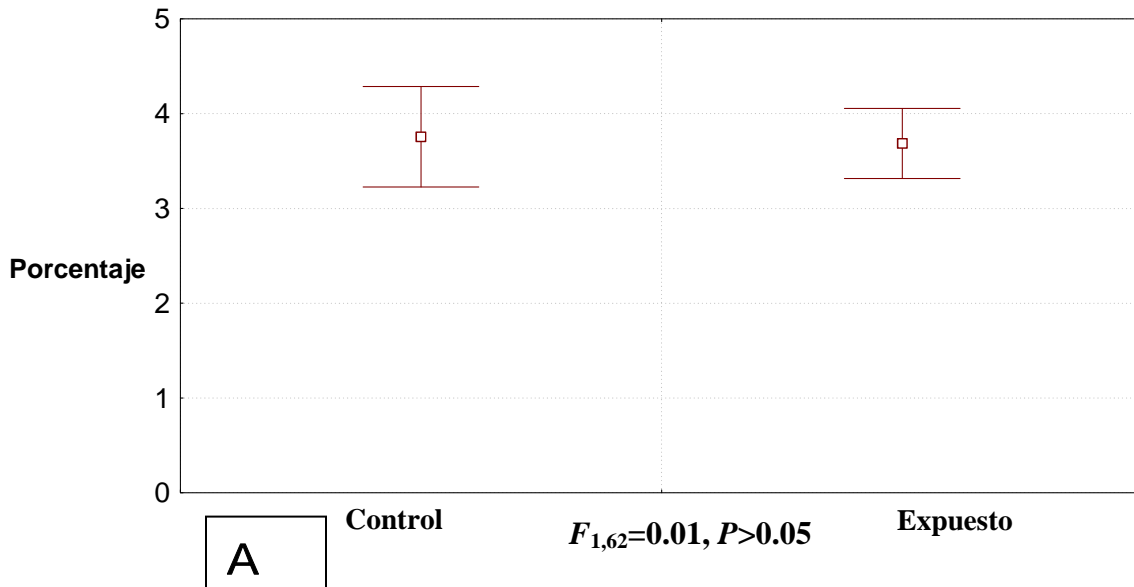
PORCENTAJE DE CÉLULAS SIN DAÑO EN LA POBLACIÓN
EXPUESTA Y CONTROLPORCENTAJE DE CÉLULAS BINUCLEADAS EN LA POBLACIÓN
EXPUESTA Y CONTROL

Figura 4. A) Porcentaje de células sin daño celular entre el grupo control y el expuesto, sin obtener diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($F_{1,62}=3.28, P>0.05$). B) Porcentaje de células binucleadas entre ambos grupos, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,62}=6.99, P<0.01$). * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al otro grupo.

PORCENTAJE DE CÉLULAS CON CARIORREXIS EN LA POBLACIÓN
EXPUESTA Y CONTROL



PORCENTAJE DE CÉLULAS CON YEMAS NUCLEARES EN LA POBLACIÓN
EXPUESTA Y CONTROL

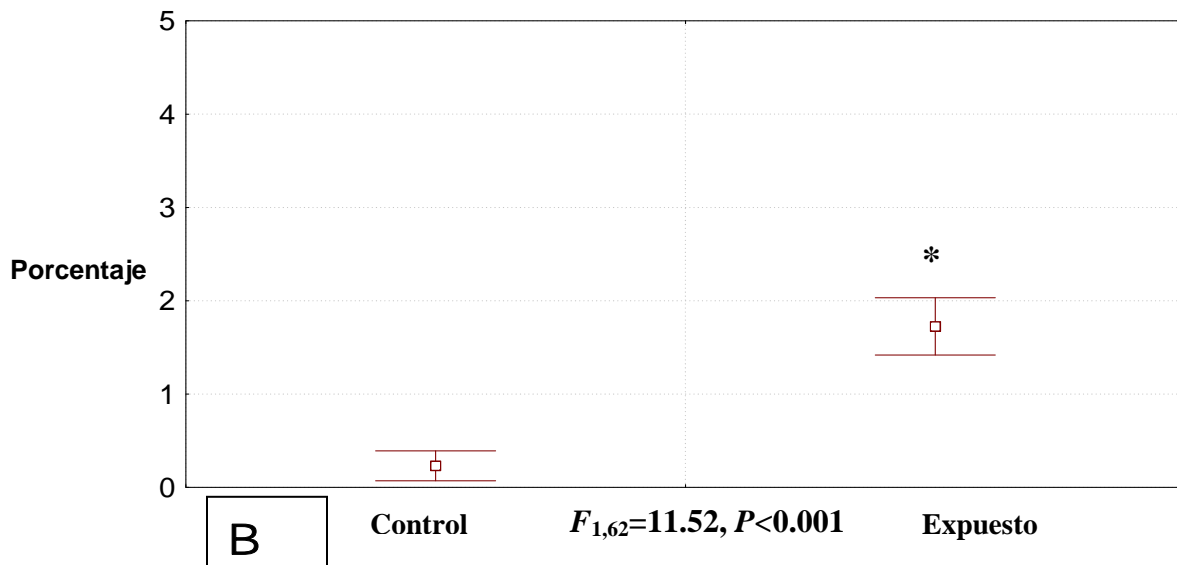


Figura 5. A) Porcentaje de células con cariorrexis entre el grupo control y el expuesto, encontrando no haber diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($F_{1,62}=0.01, P>0.05$). B) Porcentaje de células con yemas nucleares entre ambos grupos, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,62}=11.52, P<0.001$). * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al otro grupo.

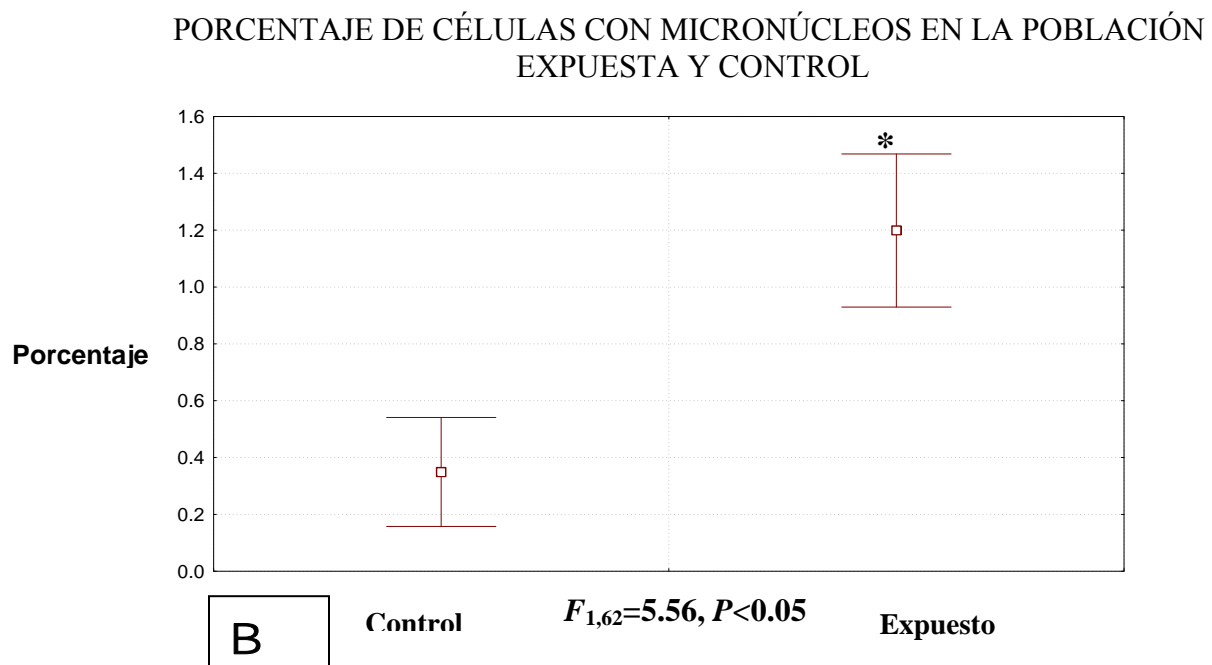
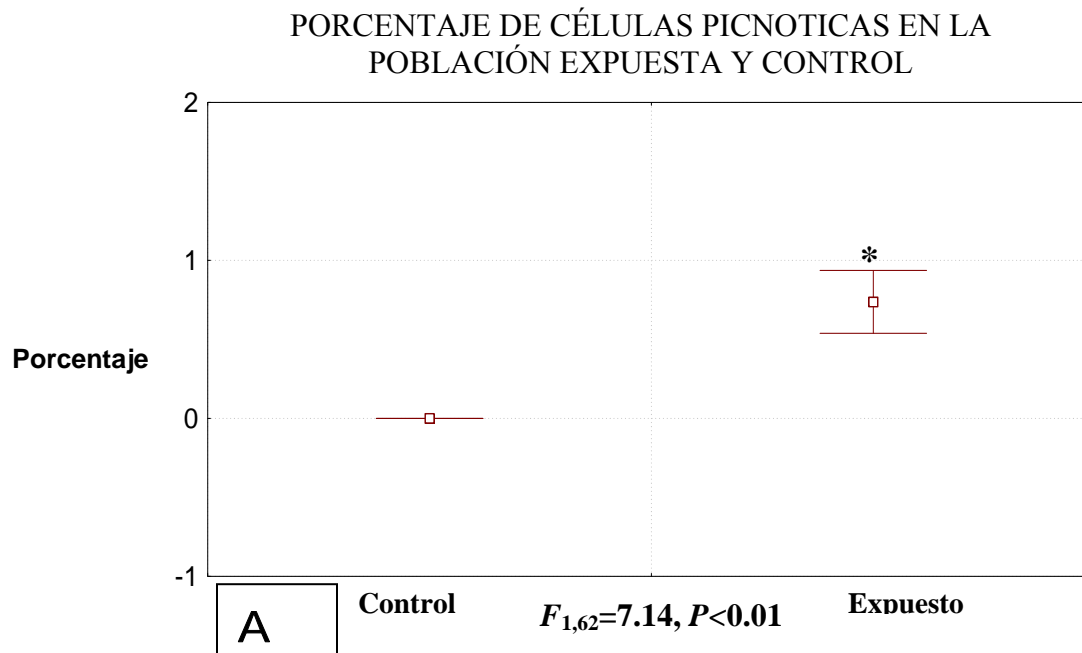


Fig 6. A) Porcentaje de células con picnosis entre el grupo control y el expuesto, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($F_{1,62}=7.14, P<0.01$). B) Porcentaje de células con micronúcleos entre ambos grupos, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,62}=5.56, P<0.05$). * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al otro grupo.

VI. DISCUSIÓN

6.1. Arsénico en el agua de Huautla, Morelos

Las elevadas cantidades de arsénico en el agua tanto de la mina como del depósito, nos señalan la grave problemática que presenta el poblado de Huautla, Morelos. Por una parte, los jales depositados en las inmediaciones del poblado, podrían representar una fuente de contaminación del suelo y agua por lixiviación de metales, sin embargo en nuestro estudio, no suelen ser el principal factor que esté contaminando el agua del poblado, ya que las características específicas de los jales de Huautla, hacen que la lixiviación de los metales sea mínima debido a que los suelos son arcillosos, esto quiere decir que los jales gracias a su capacidad de intercambio catiónico (CIC) -el cual se define por la capacidad que tiene un suelo de retener cationes electrostáticamente-, y como la mayoría de los metales se comportan como cationes, el material puede ser retenido, además de que los suelos que presentan mayor CIC, están determinados por la cantidad de arcillas, siendo aquellos con mayor cantidad de arcillas los que tengan un mayor número de cargas negativas y de ahí, el que puedan atrapar los metales (SEMARNAT 2004).

Por otro lado, la principal causa de contaminación de agua por As que se ha reportado, alrededor del mundo y en nuestro país, es aquella de origen natural (Warner *et al.* 1994, Blas 1995, Gonsebatt *et al.* 1997, Wyatt *et al.* 1998, Tondel *et al.* 1999, Chang *et al.* 2004, Martínez *et al.* 2004, Sambyal *et al.* 2004, Andrew *et al.* 2006, Ghosh *et al.* 2006) muchos de estos casos, son debido a la presencia de rocas volcánicas o sedimentarias asociadas a arsenopirita, pirita y sulfuros de arsénico.

En Morelos, la localización geográfica hace notar que sólo las rocas ígneas y sedimentarias se encuentran presentes, siendo las de tipo volcánico las que tienen un origen reciente y más abundantes, además de que en Huautla la presencia de rocas ígneas extrusivas las hacen sujetas de explotación minera o industrial. Es importante mencionar que los yacimientos presentes en la zona son de origen hidrotermal, lo que nos hace proponer a esta región, tomando en cuenta cada una de las características geológicas, como una zona expuesta a distintos metales presentes en la corteza y que están en contacto con el agua de la región, contaminándola principalmente con arsénico; por otra parte, en las minas de Huautla, los minerales predominantes son la acantita, calcita, calcolita, galena y plata los cuales se encuentran frecuentemente asociados al arsénico, de ahí que al estar en contacto con el agua, el arsénico también pueda ser solubilizado por las condiciones oxido-reductoras del medio.

6.2. Arsénico en sangre de los pobladores de Huautla, Morelos

Las concentraciones de As en sangre total, reflejan la exposición de los individuos de Huautla, Morelos al As en el agua. El arsénico una vez ingerido, se une con la porción globina de la hemoglobina y permanece en la sangre hasta después de 24 horas para posteriormente ser distribuido a otros órganos como el hígado, riñón o bazo (Blas 1995). Sin embargo los principales tejidos donde podemos encontrar cantidades de arsénico depositadas, son en el pelo y las uñas; también se encuentra en la orina.

Las cantidades en pelo y uñas, se deben a la facilidad de unión del arsénico por los grupos sulfhidrilos de la queratina, lo que hacen a estos un sitio blanco de

almacenamiento, al igual que la orina por ser el principal sitio por el donde se excreta al arsénico (Hall *et al.* 2006). Debido a esto, cada uno de ellos, ha sido utilizado como un biomarcador de exposición en humanos, pues ayudan a evidenciar al As más fácilmente que en otros tejidos. Las concentraciones encontradas en cada tejido, suelen revelar distintos tipos de exposición; para el caso de las uñas y el pelo, el almacenamiento e incorporación del arsénico se presentan después de una exposición aproximadamente de 3 meses y para la orina refleja la excreción del arsénico y no una actual ingesta del metaloide, además de que las concentraciones de creatinina en la orina hacen que las proporciones de arsénico varíen (Blas 1995), por estas razones, se han buscado otro tipo de biomarcadores que ayuden revelar las concentraciones y tipo de exposición a las que se encuentran expuestos las personas.

La sangre ha sido propuesta y utilizada como biomarcador de exposición a arsénico por consumo de agua contaminada, debido a las características que presenta, ya que puede eliminar rápidamente al arsénico por el riñón (aproximadamente después de 24 a 72 horas de haberlo ingerido por el organismo) haciendo que las concentraciones encontradas señalen una reciente exposición al metaloide por lo que lo hacen potencialmente factible el utilizarlo como un biomarcador de exposiciones agudas al As (Chen *et al.* 2005, Hall *et al.* 2006, Hughes *et al.* 2006, Gamble *et al.* 2007, Hall *et al.* 2007). Pero en condiciones de exposición crónica, de igual forma se han encontrado concentraciones de As en sangre, por lo que no sólo puede ser considerado como biomarcador de exposiciones agudas sino también a exposiciones pasadas y prolongadas. Esto se debe a que la sangre recibe entradas de As no solo de la exposición reciente exógena sino también de compartimentos de tejido, haciendo un mejor reflejo de la carga

total de arsénico en el individuo. También se ha observado una asociación positiva entre las cantidades de As en sangre y las cantidades de oxidantes en plasma, de la misma forma, hay una relación inversa a los antioxidantes en plasma, y con esto un mayor daño oxidante a bases y proteínas, por lo que la utilización de la sangre como biomarcador de exposición resulta favorable (Hall *et al.* 2006).

Varios estudios han propuesto a la sangre como biomarcador de exposición, obteniendo distintos resultados. Hughes (2006) encontró una baja relación entre la cantidad de arsénico en el agua y la encontrada en la sangre de las personas expuestas de 0.0025 a 0.031 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de arsénico en agua, las concentraciones en la sangre fueron <0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en otro grupo de personas expuestas a 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de As en el agua, reporta niveles en la sangre de 0.008 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Gamble *et al.* (2007) reporta en Bangladesh niveles de As en el agua de 0.435 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y personas expuestas muestran 0.0098 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de As en la sangre. Hall *et al.* (2007) reporta en mujeres de Bangladesh concentraciones de As en sangre de 0.011 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que ingieren agua contaminada con As de 0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para nuestro estudio el valor encontrado de As en la sangre de los pobladores de Huatla es de 0.058 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de As en el agua.

Por lo anterior, podemos mencionar que la utilización de sangre como biomarcador de exposición a As por ingesta de agua, es una fuente práctica para demostrar exposición a As, ya que en las poblaciones expuestas a As a concentraciones por arriba de los estándares permitidos, se observaron concentraciones de As en sangre. Esto nos hace proponer a la sangre como un biomarcador de exposición útil, el cual puede evidenciar las concentraciones de As por una exposición crónica al metaloide.

6.3. Presencia de Micronúcleos y cambios nucleares en epitelio bucal de individuos expuestos a As en agua de bebida

El estudio de Micronúcleos y cambios nucleares (cariorrexis, picnosis, yemas nucleares y células binucleadas), en el epitelio bucal es una fuente de información que nos proporciona los distintos tipos de daños a las que se encuentra una persona sujeta por agentes químicos o físicos, ya que cada uno de estos distintos cambios se relaciona con la alteración de un proceso celular ya sea a nivel genético o citológico (Holland *et al.* 2008). Este análisis ha sido utilizado en varios estudios como una herramienta para revelar daños por agentes genotóxicos, como los metales (Celik *et al.* 2006; Thomas *et al.* 2007; Holland *et al.* 2008). Sin embargo, la complementariedad del análisis de micronúcleos con cambios nucleares, aunque no se han delimitado como exclusivos del As no han sido investigados con otros metales por el momento.

La presencia de cambios nucleares en el epitelio bucal se considera un proceso secuencial en donde los dos primeros acontecimientos que pueden ocurrir son la aparición de micronúcleos o las yemas nucleares, ya que ambos son generados por un daño en el genoma o una alteración en el funcionamiento del huso mitótico; los cuales pueden ser acompañados por la formación de células binucleadas, posteriormente puede aparecer cariorrexis, luego picnosis y finalmente cariolisis, estos últimos por alteraciones citotóxicas (Ramírez *et al.* 2002, Thomas *et al.* 2007, Holland *et al.* 2008). Las células binucleadas ocurren debido a una alteración en los procesos de citocinesis en las células en división además de que ha sido asociada la frecuencia de estas células con alteraciones citotóxicas en epitelio bucal y en presencia de algunos cánceres.

Por otro lado, la formación de células binucleadas, micronúcleos y yemas nucleares se encuentra relacionada, ya que pueden aparecer debido a la falla en la segregación del huso mitótico. La principal causa de que suceda esto es por el ataque a la tubulina, uno de los blancos del As y por su alto contenido de grupos sulfhidrilos, principal componente del huso mitótico (Ling *et al.* 2002). Aunado a esto, podemos encontrar morfologías nucleares relacionadas, como condensación de la cromatina, la cual ocurre de la aglomeración de la cromatina durante la división mitótica, pero a causa del mal funcionamiento del huso, permanece así en la célula (Torres *et al.* 1998, Ling *et al.* 2002, Torres *et al.* 2003), con esto se menciona la posible causa de encontrar células binucleadas en el epitelio bucal y la relación con la alteración del huso mitótico para la formación de otros cambios como los MN y yemas nucleares. Esto concuerda con las diferencias estadísticamente significativas encontradas en nuestro estudio entre el grupo testigo de 5.18 células binucleadas por cada 2000 células analizadas y el expuesto de 11.71/2000 células analizadas; así como en los resultados reportados por Blas (1995) uno de los pocos estudios realizados para analizar micronúcleos y cambios nucleares por efecto de As en agua de bebida, en muestras tomadas de epitelio de vejiga. El estudio reporta para el caso de células binucleadas frecuencias de 2.78/2500 células analizadas para el grupo expuesto y 3.84/2500 células analizadas en el grupo testigo, los cuales no son estadísticamente significativos en comparación con el grupo testigo y siendo las frecuencias muy contrastantes a las de nuestro estudio, sin embargo, el autor menciona que es importante el análisis de las células binucleadas ya que sirve como revelador de daños ocasionados por el arsénico. También hay que tener a consideración las diferencias que se pueden presentar al analizar el epitelio bucal y el de vejiga en cuanto a los

cambios nucleares ya sea por las diferencias en recambio (Guzmán 1997), los distintos tipos de metabolitos o especies del As que interactúen con él (Hughes 2006) o distintos factores ambientales que puedan influir en la formación de este cambio nuclear como podría ser la masticación o el contacto con el humo del cigarrillo (Ramírez y Saldanha 2002).

Los cambios nucleares de cariorrexis y picnosis son considerados marcadores de muerte celular tanto para apoptosis como para necrosis (González *et al.* 2008, Holland *et al.* 2008). El tipo de cambio que se presente en las muestras analizadas, indica el tipo de proceso que está sufriendo el epitelio y estos cambios pueden no ser solo indicadores de daños celulares como la necrosis y apoptosis. Blas (1995) describe de la siguiente manera, como distintos cambios nucleares en el epitelio pueden indicar los distintos daños celulares entre ellos la apoptosis, necrosis así como otras respuestas celulares: Si encontramos células picnóticas y con cromatina condensada se correlacionan con procesos normales de maduración y diferenciación del epitelio. La presencia de picnosis, cromatina condensada y cariólisis así como queratinización del epitelio son respuesta a una adaptación por lesión celular en epitelios que normalmente nos son queratinizados como el bucal. Sin embargo la presencia de picnosis, cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis se darán como respuesta un proceso de necrosis el cual se da por un daño celular provocado por un agente citotóxico; pero el encontrar sólo picnosis, cromatina condensada y cariorrexis (sin la presencia de cariólisis) son indicadores tempranos de muerte por apoptosis, la cual puede ser ocasionada por agentes químicos o ionizantes. Por lo que encontrar estos cambios pueden ser marcadores de daño genotóxico (Holland *et al.* 2008). Hasta el momento existe un escaso número de publicaciones que asocien estos

cambios nucleares con estudios en epitelios humanos, por lo que no se ha podido establecer frecuencias basales para personas que no se encuentran expuestas a agentes citotóxicos o genotóxicos, ya que los pocos estudios que hay, muestran diferencias en las frecuencias reportadas (Ramírez y Saldanha 2002; Çelik *et al.* 2003; Çelik *et al.* 2006; Nersesyan *et al.* 2006; Gonzáles *et al.* 2008).

La aparición de los cambios de cariorrexis y picnosis, están de igual forma, relacionadas con el funcionamiento del huso mitótico, así la función que aporta el huso en la conformación del núcleo hace que la alteración de éste con cualquier agente, como es el caso del As, puedan provocar la deformación del núcleo (Dotiwala *et al.* 2007, Zheng *et al.* 2007), por otra parte se ha observado que el As puede hipermetilar e hipometilar las histonas del DNA, lo que ocasiona la alteración, separación, condensación o descompactación de la cromatina, estas morfologías son características histológicas de la cariorrexis y apoptosis (Ramírez *et al.* 2008) además de que se ha demostrado que el arsénico altera proteínas que se encargan de la unión de la cromatina llamadas grupo de proteínas de alta movilidad (HMG) y la alteración de proteínas de la matriz nuclear que mantienen la integridad de la cromatina (Zi-hui *et al.* 2005). Estos mecanismos son los que posiblemente estén afectando la estructura en el núcleo de las células epiteliales analizadas.

En la literatura revisada, estos dos cambios nucleares, han sido poco utilizados en poblaciones expuestas a arsénico y analizados en el epitelio bucal. Uno de ellos es el de Blas (1995), donde analizan estos dos cambios nucleares en células epiteliales de vejiga en una población mexicana de la comarca lagunera, que ingiere agua contaminada con As (0.420µg/ml). Obteniendo para las células con cariorrexis 16.06/2500 células analizadas

en el grupo testigo y 10.04/2500 células analizadas en el grupo expuesto, sin obtener diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba de “t” ($r^2=0.14$, $p>0.05$); para el caso de células picnóticas las frecuencias en el grupo testigo fue de 0.03/2500 analizadas y 2/2500 para el grupo expuesto, encontrando valores estadísticamente significativos ($p<0.05$). En comparación con otros estudios donde se han analizado estos cambios pero con distintos agentes, las incidencias son las siguientes: en un estudio de personas mexicanas expuestas a pesticidas realizado por Gómez *et al.* (2000) encontró frecuencias de células con cariorrexis en epitelio bucal de 0.2/3000 células analizadas en el grupo expuesto y 0.05/3000 células analizadas en el grupo testigo; en el caso de células con picnosis las frecuencias fueron de 0.4/3000 células analizadas en el grupo expuesto y 0.2/3000 células analizadas en el testigo. Habiendo en ambos cambios nucleares, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados ($P<0.001$). Torres *et al.* (2003) por su parte analizó estos cambios nucleares en epitelio bucal pero en personas con tratamientos antineoplásicos, encontrando valores para el caso de cariorrexis de 0.7/1000 células analizadas en el grupo expuesto y 0.1/1000 células analizadas en el grupo testigo y para las células con picnosis encontró 1.4/1000 células analizadas en las personas expuestas y 0.5/1000 células analizadas en el control. Reportando en ambos cambios nucleares, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados ($P<0.02$). En nuestro estudio, el análisis de células de cariorrexis y picnosis sólo demostró diferencias estadísticamente significativas para el caso de picnosis. El análisis del cambio nuclear de cariorrexis, reveló frecuencias de 14.08/2000 células analizadas en el epitelio bucal del grupo expuesto y de 12.27/2000 células analizadas para el grupo testigo ($F_{1,62}=0.01$, $P>0.05$). Para el caso de picnosis las

frecuencias fueron de 1.66/2000 células analizadas en el grupo expuesto y 0.0/2000 células analizadas para el grupo testigo ($F_{1,62}=7.14$, $P<0.01$).

Con los resultados antes mencionados, podemos decir que las frecuencias que se pueden encontrar en estos dos cambios nucleares de las células del epitelio bucal, pueden ser muy variadas dependiendo del agente al que se encuentren expuestos. En cuanto a los resultados obtenidos en los estudios realizados por Blas (1995) y el nuestro, no se reportan valores estadísticamente significativos entre los grupos testigo y los expuestos para el cambio de cariorrexis, y de forma contraria para las células con picnosis. Mientras que en los estudios de Gómez *et al.* (2000) y Torres *et al.* (2003), ambos cambios revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados, lo que puede mencionar que las variaciones se deben al tipo de agente genotóxico que esté dañando a las células epiteliales, ya que como se mencionó, ambos procesos son producidos por un daño en el funcionamiento del huso mitótico o por proteínas que se encargan del mantenimiento de la cromatina, lo que haría suponer que al encontrar células picnóticas, deberíamos encontrar células con cariorrexis, además de que ambos cambios pertenecen a un mismo proceso secuencial. Así, atribuir estas variaciones a la participación del arsénico como agente citotóxico, y por lo tanto el no encontrar diferencias entre los grupos para el cambio de cariorrexis, se deba a que el arsénico a nivel citológico esté mandando señales que aceleren o no hagan evidente la presencia de éste u otros cambios que deberían presentarse de manera estadísticamente significativa, por lo que las diferencias sólo son perceptibles para el caso de picnosis, como producto final de este daño celular.

Por lo que ayudados de los resultados obtenidos en nuestro estudio y los antes citados, mencionar que las personas que no se encuentran expuestas a un agente genotóxico suelen presentar una frecuencia basal de 0.03-0.5 para el caso de pincosis, mientras que en las expuestas a arsénico, se eleva hasta dos veces más esta frecuencia, lo cual es estadísticamente significativo. Proponiendo que los pobladores de Huautla están sufriendo un daño celular significativo, y la presencia de estos daños son considerados como una respuesta temprana a concentraciones elevadas de As y de manera crónica.

Las yemas nucleares son consideradas un marcador más de daño genotóxico al ser producidas por amplificación génica, o por aquellos complejos que no fueron reparados del DNA (Lindberg *et al.* 2007). Serrano y Montero (2001) mencionan que la generación de yemas nucleares puede ocurrir por dos formas: el primer caso se da por el retraso de un cromosoma durante la telofase, cuando la formación del nuevo núcleo está ocurriendo, esto dará como resultado la formación de la envoltura nuclear con una protuberancia conteniendo el cromosoma no integrado; la segunda posibilidad se da cuando hay un rompimiento cromosómico que debe ser eliminado, así durante el proceso mitótico, esta porción no será integrada al núcleo de la célula hija, por lo que se puede presentar sólo como una protuberancia en el núcleo, que posteriormente será separado del núcleo principal en forma de un micronúcleo. Además de estas dos explicaciones, mencionan que estas yemas pueden presentarse como la reintegración de un micronúcleo durante las subsecuentes divisiones celulares.

En diversos estudios se han tomado en cuenta la presencia de yemas nucleares como parte de los cambios nucleares, entre estos podemos mencionar el estudio de Torres *et al.* (2003) donde analiza las frecuencias de yemas nucleares en pacientes con cáncer

siendo tratados con atineoplásicos y en personas sanas, reportando en el primer grupo frecuencias de 0.7/1000 células analizadas y 0.6/1000 células analizadas en el grupo testigo lo cual no es estadísticamente significativo. En un grupo de personas mexicanas expuestas a pesticidas, Gómez *et al.* (2000) reporta frecuencias de yemas nucleares con 0.07/3000 células analizadas en el grupo expuesto y de 0.01 en el grupo testigo, sin ser los valores estadísticamente significativos. Pero en el estudio realizado por Blas (1995) en individuos expuestos a As en agua de bebida, las frecuencias de yemas en epitelio de vejiga fueron de 0.68/2500 células analizadas en el grupo expuesto y 0.32/2500 células analizadas en el testigo siendo los resultados estadísticamente significativos ($P < 0.05$). Nuestro estudio reporta frecuencias de 3.33/2000 células analizadas en el grupo expuesto a As por agua en epitelio bucal y 0.54/2000 células analizadas en el grupo testigo siendo los resultados estadísticamente significativos ($F_{1,62} = 11.52$, $P < 0.001$). Al comparar el estudio de Blas (1995) y el nuestro, notamos que si existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a los testigos. Esto posiblemente pueda deberse a las causas que originan una yema nuclear; hasta el momento se han mencionado dos tipos de origen, una de tipo nuclear y otra citológica, en donde la primera se da por un daño en el DNA que provoca el rompimiento de éste y el segundo por una falla en el funcionamiento del huso mitótico (Lindberg *et al.* 2007, Serrano y Montero 2001). Cualquiera que sea el origen, la presencia de uno no es excluyente del otro, por lo que muy posiblemente la alteración de ambos mecanismos esté influyendo a que en ambos estudios encontremos diferencias entre los grupos analizados, pues como se ha mencionado con los otros cambios nucleares, el daño al huso mitótico es de gran importancia para mantener la morfología del núcleo y que para el As resulta un sitio blanco de ataque, sumado a los

posibles daños estructurales que esté ocasionando el As al DNA para causar las diferencias estadísticamente significativas reportadas en ambos estudios.

Los micronúcleos pueden ser ocasionados por el arsénico al generar EROS y oxidar las bases del DNA para posteriormente provocar el rompimiento como causa de esta alteración a las bases, al alterar mecanismos de reparación por la misma generación de EROS, al unirse a los grupos sulfhidrilos de las proteínas de estos mecanismos e inhibir su actividad, o al alterar la segregación cromosómica por afectar a los microtúbulos del uso mitótico la cual también posee grupos sulfhidrilos impidiendo el ensamblaje de los microtúbulos (Yi *et al.* 2007).

El Human Micronucleus Project (HUMN) estandarizó hace ya más de una década la técnica de Micronúcleos para analizar daño genotóxico y que sirve como biomarcador de efecto temprano, esto se implementó con la utilización de linfocitos de sangre periférica, sin embargo los biomarcadores deben ser lo menos invasivos posibles, por lo que actualmente el uso de epitelio bucal para el análisis de los MN lo hace un excelente biomarcador, debido a que no es invasivo, es rápido y más económico en comparación con otro tipo de muestras (como la sangre o urotelio), los cuales se han utilizado para el análisis del DNA en humanos (Holland *et al.* 2008). Los Micronúcleos resultan ser una herramienta muy útil para el biomonitoreo de poblaciones expuestas a agentes genotóxicos debido a que es un biomarcador de efecto temprano, lo cual nos indica, alteraciones bioquímicas o genéticas que dependiendo de su frecuencia, pueden ser considerados como un daño temprano que podría tener consecuencias sobre la salud a causa de un agente tóxico (Blas 1995, Chen *et al.* 2005). Por lo que la presencia de micronúcleos nos revela información acerca de las alteraciones que presenta la célula a

nivel genético, lo cual es de suma importancia debido a la asociación que hay con procesos carcinogénicos, ya que se ha encontrado en diversos estudios una relación directa entre la presencia de micronúcleos y la incidencia de cáncer (Bloching *et al.* 2000, Bhattathiri 2001, Torres *et al.* 2003, Basu *et al.* 2004).

Con esta técnica, se han realizado diversos estudios alrededor del mundo sobre el efecto del arsénico en el epitelio bucal analizando el daño genotóxico a partir de la ingesta de agua contaminada por el metaloide. Sambyal *et al.* (2004) realizaron la prueba de micronúcleos en epitelio bucal de individuos expuestos a As en agua de bebida, encontrando frecuencias de 0.01 MN/500 células analizadas en el grupo expuesto y 0.001 MN/500 células del grupo testigo, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Basu *et al.* (2004) analiza las frecuencias de micronúcleos en epitelio bucal en uno de los poblados de la india expuesta a As en agua de bebida reportando que las incidencias en el grupo testigo son de 1.28 MN/1000 células analizadas y en el grupo expuesto 5.94 MN/1000 células analizadas, habiendo entre los grupos diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$). Ghosh *et al.* (2008) analiza casos de personas con enfermedad de Bowen por arsénico mencionando que las frecuencias de MN en epitelio bucal en estos pacientes son de 5.85 MN/1000 células analizadas y 4.74 MN/1000 células analizadas del grupo testigo reportado diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.04$). Gonsebatt *et al.* (1997) encuentra en sujetos de la Comarca Lagunera, México expuestos a agua contaminada con As, frecuencias de micronúcleos en epitelio bucal de 2.21 MN/1000 células y 0.056 MN/1000 células del grupo testigo siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Para el presente estudio, el promedio de MN encontrados en el epitelio bucal de los individuos expuestos fue de 1.85 MN/2000 células

analizadas y para el grupo testigo fueron de 1.27 MN/2000 células, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,62}=5.56$, $P<0.05$). Con esto podemos mencionar que el análisis de micronúcleos en el epitelio bucal, resultó ser un buen biomarcador de exposición a As.

Tomando en cuenta cada uno de los resultados obtenidos para los cambios nucleares, se pueden relacionar tratando de ubicar de una manera más amplia la problemática del poblado de Huautla al ingerir agua con As. Primero relacionamos las elevadas incidencias de micronúcleos con la aparición de yemas nucleares, ya que este último cambio es considerado un predecesor a los micronúcleos, por lo que ambos datos nos muestran un importante daño genotóxico. Así mismo, a esta relación podemos agregar las diferencias significativas que encontramos para el caso de las células binucleadas, que aunque no nos revelan un daño directo al DNA, nos indican una falla en la segregación del núcleo. Además de que este último cambio, es considerado como parte de un daño citotóxico, por lo que su presencia ayuda a sustentar los datos obtenidos para el caso de picnosis, los cuales podrían señalar procesos tempranos de apoptosis o una respuesta a estrés celular que esté provocando esta actividad. Con los resultados obtenidos en este estudio, podemos pensar que los pobladores de Huautla, Morelos presentan un mayor riesgo a la salud ya que una elevada frecuencia de MN esta relacionada con procesos neoplásicos y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, hacen falta realizar más estudios al respecto para fortalecer este escenario. Por lo que con el presente estudio se aporta información acerca de cómo la utilización conjunta de micronúcleos con cambios nucleares, como método para analizar daños genotóxicos y citotóxicos, dan un panorama más amplio de la magnitud del daño presente en los

individuos expuestos a As, además de ser uno de los pocos estudios que integran esta metodología en epitelio bucal para medir el daño genotóxico a causa del As. También se muestra que la utilización del epitelio bucal para estudios de genotoxicidad resulta de gran utilidad y evidencia los daños provocados por agentes clastogénicos y aneugénicos como el As. Finalmente, cabe resaltar la importancia de realizar estudios como éste, en el cual se abordan problemas de contaminación ambiental con repercusiones en el ámbito social dentro de zonas protegidas como la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla.

VII. Conclusiones

- Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el agua de la mina “Pájaro Verde” en el poblado de Huautla, Morelos, está contaminada por arsénico y que los individuos muestreados están expuestos a él mediante este recurso.
- La concentración de arsénico encontrada en el agua de la mina “Pájaro Verde” y en el depósito del poblado de Huautla, Morelos, sobrepasan los límites máximos permisibles establecidos por normas nacionales e internacionales.
- La concentración de arsénico en sangre periférica de los individuos expuestos corrobora la exposición a este metaloide, lo que refuerza su utilización como biomarcador de dosis interna.
- En general, los cambios nucleares analizados en el epitelio bucal (picnosis, células binucleadas) de los individuos expuestos denotan alteraciones citotóxicas –muerte celular y alteraciones en el citoesqueleto- por parte del arsénico.

- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la inducción de daño genético (micronúcleos y yemas nucleares) en epitelio bucal, de los individuos expuestos en comparación con los individuos controles. Ya que los micronúcleos son utilizados como un biomarcador de daño temprano, podemos decir que los individuos muestreados presentan un mayor riesgo a la salud.
- Este es el primer estudio que refiere contaminación por arsénico en la zona y riesgo a la salud en pobladores expuestos.

VIII. Literatura Citada

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **2000**. *Medical management guidelines for acute chemical exposure*. Vol. III. Department of Health and Human Services. Atlanta, Estados Unidos. pp 22.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **2005**. *Toxicological profile for arsenic (Draft for public comment)*. Department of Health and Human Services. Atlanta, Estados Unidos. pp 533.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs. **2008**. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio, pp 227.
- Andrew A, Burgess J, Meza M, Demidenko E, Waugh M, Hamilton J. y Karagas M. **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.
- Andrewes P, Kitchin K. y Wallace K. **2003**. Dimethylarsine and trimethylarsine are potent genotoxins in vitro. *Chemical Research in Toxicology* 16:994-1003.
- Arboleda Y, Stella L, Carvajal S. y Sierra C. **2004**. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. *Panamericana de Salud Publica* 15:367-372.
- H. Ayuntamiento Constitucional de Tlalquintenango Morelos. **2003**. *Plan de desarrollo, Tlaquiltenango, Morelos*. Dirección General de Legislación. pp 56.
- Basu A, Ghosh P, Das J, Banerjee A, Ray K. y Giri A. **2004**. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: A comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13:820-827.
- Basu A, Som A, Ghoshal S, Mondal L, Chaubey R, Bhilwade H, Rahman M. y Giri A. **2005**. Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicology Letters* 159:100-112.
- Bau D, Wang T, Chung C, Wang A. y Jan K. **2002**. Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross links are the major DNA lesions induced by arsenite. *Environmental Health Perspectives* 110:753-756.
- Bhattathiri V. **2001**. Amitotic cell division and tumor growth: An alternative model for cell kinetic compartments in solid tumor. *Oral Oncology* 37:288-295.

- Blas J. T. **1995**. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células uroepiteliales de individuos con exposición ambiental a arsénico. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger Ch, Berghaus A. y Grummt T. **2000**. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology* 36:550-555.
- Camacho M. y Gamboa J. **2003**. Biodisponibilidad de metales en agua salobre (3UPS) y su efecto tóxico en el langostino *Macrobrachium rosenbergii*. *Revista de Toxicología en Línea* 11:2-11.
- Carré M, Carles G, André N, Douillard S, Ciccolini J, Briand C. y Braguer D. **2002**. Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 63:1831-1842.
- Carrizales L, Jasso Y, Espinosa G, Torres A. y Díaz F. **2004**. *Diseño y aplicación de un método para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México*. Departamento de Toxicología Ambiental. Facultad de Medicina. San Luis Potosí, México. pp 66.
- Çelik A. y Kanik A. **2006**. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47:693-698.
- Çelik A, Çavas T. y Ergene S. **2003**. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: Micronucleus test in exfoliated buccal cell. *Mutagenesis* 18:417-421.
- Chang C, Ho S, Tsai S. y Yang C. **2004**. Ischemic heart disease mortality reduction in an arseniasis-endemic area in southwestern Taiwan after a switch in the tap water supply system. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 67:1353-1361.
- Chen C, Hsu L, Wang C, Shih W, Hsu Y, Tseng M, Lin Y, Chou W, Chen C, Lee C, Wang L, Cheng Y, Chen C, Chen S, Wang Y, Hsueh Y, Chiou H. y Wu M. **2005**. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206:198– 206.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). **2005**. Subgerencia de exploración y monitoreo geohidrológico.
- Cooper C. y Gillespie W. B. **2001**. Arsenic and mercury concentration in major landscape components of an intensively cultivated watershed. *Environmental Pollution* 111:67-74.

- Cortinas de Nava C. **2006**. Manejo ambiental de los relaves o jales mineros. Instituto Nacional de Ecología. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetitas/155/cortinas.html>
- Cruz J. C, Arcos J, Martín F. y González G. **2004**. Caracterización mineralógica de jales procedentes del beneficio de sulfuros metálicos. División en Ingeniería en Ciencias de la Tierra. Departamento de Geología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dorado O, Maldonado B, Arias D, Ramírez S, Leyva E. y Valenzuela D. **2005**. Programa de conservación y manejo reserva de la biosfera Sierra de Huautla. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México pp 85.
- Dotiwala F, Haase J, Arbel-Eden A, Bloom K y Haber J. **2007**. The yeast DNA damage checkpoint proteins control a cytoplasmic response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104:11358-11363.
- Environmental Protection Agency (EPA). **1996**. In vivo sister chromatid exchange assay. Health effects test guidelines. Office of prevention, pesticides and toxic substances. OPPTS 870.5915. EPA 712:96-235. Washington, Estados Unidos.
- Environmental Protection Agency (EPA). **1998**. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Health effects test guidelines. Office of prevention, pesticides and toxic substances. OPPTS 870.5395. EPA 712:98-226. Washington, Estados Unidos.
- Environmental Protection Agency (EPA). **2004**. Drinking water standards and health advisories. Office of water, U.S. EPA822R04005. Washington, Estados Unidos.
- Estrada E. y Uribe M. **2002**. *Atlas de Histología de Vertebrados*. Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Food and Drug Administration (FDA). **2000**. Office of food additive safety, Redbook, Toxicological principles for safety assessment of food ingredients. <http://www.cfsan.fda.gov/redbook/red-toca.htm>.
- Florea A. **2004**. Toxicity of alkylated derivatives of arsenic, antimony and tin in vitro: Cellular uptake, cytotoxicity, genotoxic effects, perturbation of Ca²⁺, homeostasis and cell death. Tesis de doctorado presentada a la facultad de Biociencias y Geociencias, Universidad de Duisburg-Essen, Alemania.
- Florez J, Armijo J. y Mediavilla A. **1997**. *Farmacología humana*. 3ª edición. Editorial Masson, S.A., Barcelona, España. pp 541.

- Gamble M, Liu X, Slavkovich V, Pilsner R, Ilievski V, Litvak P, Levy D, Alam S, Islam M, Parvez F, Ahsan H. y Graciano J. **2007**. Folic acid supplementation lowers blood arsenic. *American Journal of Clinical Nutrition* 86:1202–1209.
- Gómez S, Díaz Y, Meneses M, Villalobos R. y De Leon J. **2000**. Cytogenetic biomonitoring in a mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research* 466:117–124.
- Gonsebatt M, Vega L, Salazar A, Montero R, Guzmán P, Blas J, Del Razo L, García G, Albores A, Cebrián M, Kelsh M. y Ostrosky P. **1997**. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutation Research* 386:219-228.
- González A, Kornhauser C, Barbosa G, Pérez E, Wrobel K. y Wrobel K. **2008**. Exposure to organic solvents and cytogenetic damage in exfoliated cells of the buccal mucosa from shoe workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 82:1-8.
- Gosh P, Basu A, Mahata J, Basu S, Sengupta M, Das J, Mukherjee A, Sarkar A, Mondal L, Ray K. y Giri A. **2006**. Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *International Journal of Cancer* 118:2470-2478.
- Ghosh P, Basu A, Singh K. y Giri A. **2008**. Evaluation of cell types for assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population. *Molecular Cancer* 7:1-7.
- Gutiérrez M. y Moreno M. **2005**. Los residuos en la minería mexicana. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los_residuos.html
- Guzmán D. **1997**. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales como prueba para detectar exposición crónica a arsénico. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hall M, Chen Y, Ahsan H, Slavkovich V, van Geen A, Parvez F. y Graciano J. **2006**. Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: Results from a prospective study. *Toxicology* 225:225–233.
- Hall M, Gamble M, Slavkovich V, Liu X, Levy D, Cheng Z, van Geen A, Yunus M, Rahman M, Pilsner R. y Graciano J. **2007**. Determinants of arsenic metabolism: Blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal–newborn pairs. *Environmental Health Perspectives* 115:1503–1509.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T. y Bürkle A. **2002**. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell

cycle control: Molecular mechanisms. *Environmental Health Perspectives* 110:797-799.

- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S. y Fenech M. **2008**. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research* 659:93–108.
- Hughes M. **2006**. Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives* 114:1790–1796.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). **2006**. Rehabilitación de la planta potabilizadora para mejorar la calidad de agua de Ajuchitlán, Morelos. Proyecto TC-0663.3 Coordinación de Tratamiento y calidad del Agua. Subcoordinación de potabilización. Morelos. México.
- Kang Y, Yi M, Kim M, Park M, Bae S, Knag C, Cho C, Park I, Park M, Rhee C, Hong S, Chung H, Lee Y. y Lee S. **2004**. Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Research* 64:8960-8967.
- Kirsch-Volders M. y Fenech M. **2001**. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16:51-58.
- Kligerman A, Doerr C, Tennant A, Harrington-Brock K, Allen J, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop B, Mass M. y De Marini D. **2003**. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: Induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42:192-205.
- Li Y. y Brome J. **1999**. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Research* 59:776-780.
- Ling Y, Jiang J, Holland J. y Perez-Soler R. **2002**. Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines. *Molecular Pharmacology* 62:529-538.
- Lindberg H, Wang X, Järventaus H, Falck G, Norppa H. y Fenech M. **2007**. Origen of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research* 617:33-45.

- Lu J, Chew E, Holmgren A. 2007. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:12288–12293
- Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck J. P, Gebel T. W, Surallés J. y Marcos R. **2004**. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutation Research* 564:65-74.
- Mejía, J, Carrizales L, Rodríguez V, Jiménez M. y Díaz F. **1999**. Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pública de México* 41:132-140.
- Méndez J, García G, López L, Calderón E, Gómez A, Vera E, Valverde M, Cebrián M. y Rojas E. 2008. Genotoxic effects of environmental exposure to arsenic and lead on children in region lagunera, México. *New York Academy of Sciences* 1140: 358–367.
- Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. **2000**. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México.
- Montero R, Serrano L, Dávila V, Segura Y, Arrieta A, Fuentes R, Abad I, Valencia L, Sierra P. y Camacho R. **2003**. Metabolic polymorphism and the micronucleus frequency in bucal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42:216-222.
- Monroy M, Diaz-Barriga F, Razo I. y Carrizales L. **2002**. Evaluación de la contaminación por arsénico y metales pesados (Pb, Cu, Zn) y análisis de riesgo en salud en Villa de la Paz-Matehuala, S.L.P. Instituto de Metalurgia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Mussali P. **2001**. ¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción del daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Mussali P, Avila M, Piñón G, Martínez G, Rodríguez V, Rojas M, Avila M. y Fortoul T. **2005**. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicology and Industrial Health* 21:155-166.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). **1997**. Guideline for the testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleust test. Guideline 474. pp 10.

- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) **2005**. Draft detailed review paper on transgenic rodent mutation assays. Existing Genotoxicity Assays. Series on Testing and Assessment N° XX. pp 529.
- Olive P. y Banáth J. **1993**. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *International Journal of Radiation Biology* 64:349-358.
- Pastor S, Lucero L, Gutiérrez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus A. y Marcos R. **2002**. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 7:79-82.
- Park M, Kang Y, Park I, Kim C, Lee Y, Chung H. y Lee S. **2007**. Combination treatment with arsenic trioxide and phytosphingosine enhance apoptotic cell death in arsenic trioxide-resistant cancer cell. *Molecular Cancer Therapeutics* 6:82-92.
- Peña S. y García M. **2006**. Avances de la actualización hidrológica de la subcuenca la poza, estado de Sonora. *Geohidrología* 26:1-14.
- Ramírez A. y Saldanha P. **2002**. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research* 1:246-260.
- Ramirez T, Brocher J, Stopper H. y Hock R. **2008**. Sodium arsenite modulates histone acetylation, histone deacetylase activity and HMGN protein dynamics in human cells. *Chromosoma* 117:147-157.
- Ryan R. y Terry C. **1997**. *Toxicology Desk Reference*. 4th ed. Volumes 1-3. Taylor & Francis, Washington, Estados Unidos. pp 2317.
- Ryan R, Terry C. y Leffingwell S. **2000**. *Toxicology Desk Reference*. 5th ed. Volumes 1-2. Taylor & Francis Philadelphia, Estados Unidos. pp 378.
- Razo I, Carrizales L, Castro J, Díaz-Barriga F. y Monroy M. **2004**. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climated mining area in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution* 152:129-152.
- Ross M, McMillan T, Wikcox P. y Collins A. **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. *Mutation Research* 337:57-60.
- Rossman T. **2003**. Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. *Mutation Research* 533:37-65.

- Salnikow K. y Zhitkovich A. 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic and chromium. *Chemical Research in Toxicology* 21:28-44.
- Sambyal V, Kaur R, Chaudhary S. y Amar S. 2004. High frequency of micronuclei in buccal mucosa of women residing near a sewage disposal drain in Amritsar. *Anthropologist* 6:125-129.
- Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), (PROFEPA). 1998. Informe trianual 1995-1997, México.
- Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). 2000. Identificación y caracterización de sitios contaminados con residuos peligrosos. Dirección General Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. Instituto Nacional de Ecología, México.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2004. Primer informe del Proyecto: Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con arsénico. Dirección de investigación en residuos y proyectos regionales. Dirección General del Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental INE, México. pp 46.
- Serrano L. y Montero R. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38:38-45.
- Sherman I. y Sherman V. 1992. *Rastreo del cáncer. Biología*. McGraw-Hill Interamericana S.A. México. pp 740.
- Singh A. y Kumar M. 2008. Increased frequency of micronucleated exfoliated cells among humans exposed in vivo to mobile telephone radiations. *Mutation Research* 650:175–180.
- Sykora P. y Snow E. 2007. Modulation de DNA polymerase beta-dependent base excision repair in cultured human cell after low dose exposure to arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228:385-394.
- Thomas P, Hecker J, Faunt J. y Fenech M. 2007. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated whit Alzheimer´s disease. *Mutagenesis* 22:371-379.
- Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Chowdhury I, Faruquee M. y Ahmad A. 1999. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Banlgladesh. *Environmental Health Perspectives* 107:727-729.
- Torres O, De Anda A, Ramirez M, Sánchez J, Cantu J. y Zúñiga G. 1998. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers bymicronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutation Research* 413:277–281.

- Torres O, Ventura A, Zamora A, Gómez B, Ramos M, Morgan G, Gutiérrez A. y Zúñiga G. **2003**. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutation Research* 539:177–186.
- Vahter M. **2008**. Health effect of early life exposure to arsenic. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102:204-211.
- Vuyyuri S, Ishaq M, Kuppala D, Grover P. y Ahuja Y. **2006**. Evaluation of micronucleus frequencies and damage in glass worker exposed to arsenic. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47:562-570.
- Warner M, Moore L, Smith M, Kalman D, Fanning E. y Smith A. **1994**. Increased micronuclei in exfoliated bladder of cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 3:583-590.
- West Midlands Toxicology Laboratory. **2005**. Guide to trace elements monitoring service. West Midlabs. Reino Unido.
- Wojewódzka, M, Gradzka I. y Buraczewska I. **2002**. Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika* 47:1-5.
- Wyatt C, Fimbres C, Romo L, Méndez R. y Grijalva L. **1998**. Incidence of heavy metal contamination in water supplies in northern México. *Environmental Research* 76:114-119.
- Yi H, Wu L. y Jiang L. **2007**. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium-root* micronucleus assay. *Science of the Total Environment* 383:232-236.
- Zar J,H. **1999**. Biostatistical analysis. Prentice Hall. Nueva Jersey, USA. 663pp.
- Zhang A, Feng H, Yang G, Pan X, Jiang X, Huang X, Dong X, Yang D, Xie Y, Peng L, Jun L, Hu C, Jian L. y Wang X. **2007**. Unventilated indoor coal-fired stoves in Guizhou province, China: Cellular and genetic damage in villagers exposed to arsenic in food and air. *Environ Health Perspect* 115:653-658.
- Zheng L, Schwartz C, Magidson V, Khodjakov A. y Oliferenko S. **2007**. The spindle pole bodies facilitate nuclear envelope division during closed mitosis in fission yeast. *PLoS Biology* 5:1530-1542.
- Zi-hui W, Ding Y, Yan C. y Jian-zhong H. **2005**. Proteomic analysis of nuclear matrix proteins during arsenic trioxide induced apoptosis in leukemia K562 cells. *Chinese Medical Journal* 118:100-104.