

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

BIOMONITOREO GENOTÓXICO EN RENACUAJOS DE LA RANA
Lithobates montezumae Y ANÁLISIS DE METALES PESADOS E
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EL RÍO TULA,
ESTADO DE HIDALGO, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

CAMILO TOVAR PACHECO

ASESORES:

Dra. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
M.P.A. FRIDA SALMERÓN SOSA

México, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

**A mi Cristo Jesus bendito que me ha llevado en brazo y el sí me ha sabido
ser fiel.**

A quienes me aman y amo

Agradecimientos

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera

Al programa PAPIIT por financiar el proyecto

MPA Frida Salmerón Sosa

Dra. M E. calderón segura, Roció García Martínez

Y finalmente a mi familia y queridos amigos que son la otra familia en la vida

Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Biomarcadores.....	4
Importancia del biomonitorio.....	5
Ensayo cometa alcalino (biomarcador de exposición y de efecto temprano).....	5
Importancia de los anfibios como modelo animal de investigación genotoxicológica	8
<i>Lithobates montezumae</i> (Rana montezuma).....	9
Contaminación por metales pesados en México.....	11
Metales pesados.....	11
Mecanismos de acción tóxica de los metales pesados (Cd, Cr, Hg, Pb y Fe).....	12
Rutas para el transporte de elementos traza en el ambiente.....	16
Plomo.....	17
Mercurio.....	21
Cadmio.....	22

Hierro.....	24
Cromo.....	26
Hydrocarburos aromáticos policíclicos.....	27
Efectos sobre la salud humana y el medio ambiente.	28
Contaminación con hidrocarburos.....	29
Contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	31
Antraceno.....	33
a-Benzopireno	34
Hipótesis.....	36
Objetivo general.....	36
Objetivos específicos.....	36
Material y métodos.....	37
HPLC Cromatografía líquida de alta resolución.....	38
Toma de la muestra sanguínea.....	39
Ensayo cometa alcalino (electroforesis unicelular alcalina).....	40
Método estadístico.....	41
Resultados	42

Ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina.....	42
Detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	42
Detección de metales pesados.....	42
Genotoxicidad.....	43
Discusión.....	44
Conclusiones.....	46
Referencias.....	49
Anexo.....	64

Resumen

Tovar Pacheco Camilo Biomonitorio genotóxico en renacuajos de la rana *Lithobates montezumae* y análisis de metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos en el río Tula, estado de Hidalgo, México (bajo la dirección de Dra. María Elena Calderón Segura y M.P. A. Frida Salmerón Sosa).

El aumento de la contaminación ambiental se puede atribuir a los cambios en las actividades antropogénicas. Los contaminantes genotóxicos afectan a los ecosistemas acuáticos como terrestres. El ensayo cometa, también conocido como electroforesis unicelular alcalino, es una herramienta para evaluar el daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) en poblaciones expuestas a genotoxícos como metales pesados (MP) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Se realizó biomonitorio genotóxico en hemocitos periféricos de renacuajos de la rana verde *Lithobates montezumae* y la detección de MP y HAPs en muestras de agua del río Tula, procedentes del hábitat natural de esta especie. Los resultados obtenidos evidencian daño significativo ($p < 0.0001$) en el ADN de la población de renacuajos de *L. moctezumae*, comparado con un grupo de renacuajos control. Las concentraciones de HAPs en el agua del río Tula y manantial son irrelevantes. Las cantidades de metales pesados en el agua del río Tula son las siguientes, cromo (0.725 mg/L), cadmio (0.187 mg/L), mercurio (0.487 mg/L) plomo (1.753 mg/L) y fierro (0.422 mg/L), encontrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto a la referencia y control negativo.

Introducción

En México, no existe legislación para que se realicen pruebas sistemáticas de monitoreo y seguimiento para evitar la presencia de sustancias tóxicas que contaminan los ecosistemas.

Muchos xenobióticos y sustancias químicas liberadas en el medio ambiente entran a los organismos en forma de partículas disueltas o complejos químicos suspendidos procedentes de la lluvia o por descargas directas de los drenajes de las ciudades a los embalses.¹ Entre las sustancias tóxicas principalmente producidas por el hombre están: metales pesados (cadmio, plomo, mercurio, cromo, cobalto), y metaloides (arsénico, aluminio), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y otros derivados químicos que en conjunto se potencializan y se bioacumulan causando daños a nivel molecular en las células.

En la actualidad la mayoría de los cauces hidrológicos reciben descargas de contaminantes de toda índole ocasionando reducción de la calidad del agua y alterando a las comunidades biológicas. Sin embargo, los mecanismos genotóxicos de los contaminantes son pobremente comprendidos. Actualmente los ecosistemas acuáticos están seriamente afectados principalmente por la presencia de genotoxinas ambientales que algunas veces favorecen el crecimiento de organismos indeseables que alteran las cadenas tróficas provocando decremento de la calidad del medio y de la salud.¹ El uso de biomonitores, permite vigilar los efectos de los contaminantes en el medio natural, como es el caso del Río Tula.

La rivera del río Tula corre por el estado de Hidalgo, y desde la construcción del sistema de desagüe de la Cuenca de México (siglo XVII) este río recibe las aguas de los ríos del Valle de México. De acuerdo con datos de la Comisión Nacional del Agua, este río es uno de los más contaminados del país, ya que recibe 409,420 millones de m³ anuales de aguas residuales.² Seguramente el ecosistema se ha visto afectado y los organismos vivos tal vez presentan alteraciones, que repercuten en las tasas de desarrollo y sobrevivencia de la biota.¹ De acuerdo a lo anterior, existe interés en el desarrollo de biomarcadores de genotoxicidad en diferentes especies y la necesidad de aumentar nuestra comprensión de los efectos genotóxicos en la salud de los organismos, por lo que es necesario realizar estudios en animales silvestres expuestos a ambientes contaminados. El biomonitoreo del medio ambiente es necesario para vigilar la salud de las especies. Estas pruebas deben ser rápidas, exactas y reproducibles para detectar a tiempo daños irreparables. El ensayo cometa alcalino (Electroforesis Unicelular Alcalina) es una prueba que detecta rompimientos de cadena doble y sencilla en regiones lábiles del ácido desoxirribonucleico (ADN) y puede usarse para la vigilancia de los ecosistemas de México, por ser muy sensible, rápida y fiable.¹ La sencillez y la sensibilidad del ensayo cometa lo convierten en una prueba genética adecuada para biomonitorear ecosistemas contaminados y un adecuado biomarcador de efecto temprano y exposición a genotoxinas ambientales.^{3,4,5}

Actualmente se desarrollan estudios de investigación sobre el efecto adverso de los genotóxicos ambientales y pocos son los trabajos donde se reporta genotoxicidad ambiental *in situ* e *in vivo* con especies endémicas que han

presentado alteraciones en las tasas de desarrollo y sobrevivencia, que las han llevado al peligro de extinción, como *Lithobates montezumae* (rana montezuma) originaria de México. Esta especie se ha encontrado en la Rivera del Río Tula.

BIOMARCADORES

Los biomarcadores son mediciones tomadas en matrices (pelo, orina, uñas) y tejidos biológicos (sangre, células epiteliales de descamación) sobre la respuesta que se origina por la exposición a sustancias químicas poco frecuentes en la naturaleza u originadas artificialmente por el ser humano y que son tóxicas para los seres vivos, conocidas como xenobióticos. Las respuestas a dichas sustancias pueden ser alteraciones bioquímicas, fisiológicas y/o morfológicas⁶.

Se caracterizan por ser poco invasivos, específicos, sensibles y confiables. Son herramientas que pueden ser evaluadas en cultivos celulares y en modelos animales, y también en poblaciones humanas expuestas a un agente tóxico⁶. Los biomarcadores se clasifican en:

- Biomarcadores de exposición. Puede ser un compuesto químico exógeno, los metabolitos generados por dicho compuesto o el producto de la interacción con una biomolécula. Nos indican la concentración del xenobiótico en un tejido u órgano.
- Biomarcadores de efecto. Son cambios bioquímicos como son las alteraciones en las actividades enzimáticas, lesiones en el ADN o aductos de lípidos y proteínas. Pueden ser de efecto temprano ya que nos indican el desarrollo a ciertas enfermedades. Ejemplos de este tipo de biomarcador son el análisis de aberraciones cromosómicas (intercambios de cromátidas, translocaciones, deleciones) y la frecuencia de micronúcleos. Cuando se

ha iniciado una enfermedad se pueden aplicar los biomarcadores de efecto tardío como la evaluación de la expresión de microRNA's.

- Biomarcadores de susceptibilidad. Nos indican la susceptibilidad individual hacia un xenobiótico. El polimorfismo génico, la actividad de una enzima hacia un componente en el metabolismo o la eficiencia de reparación del ADN⁷.

Importancia del biomonitoreo

El monitoreo biológico *in situ* e *in vivo* es crítico en la evaluación a la exposición a sustancias tóxicas y contaminantes ambientales, ya que proporciona evidencia directa del tipo y la magnitud de dicha exposición. Los anfibios expuestos a los contaminantes reflejan la cantidad real de daño sobre el ADN. Por lo tanto, es importante monitorear clínica y toxicológicamente a individuos que se encuentran expuestos a genotoxinas^{4, 5, 8, 9}

Ensayo cometa alcalino (biomarcador de exposición y de efecto temprano)

Existen diferentes sistemas de prueba para detectar daño al ADN como son los micro núcleos, aductos, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y otros. Actualmente el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalino es más usado para evaluar el efecto de los contaminantes ambientales sobre el ADN. Esta técnica de fluorescencia es rápida, sencilla y sensible para detectar rompimientos de una o doble cadena de ADN, tanto en los sitios alcalilábiles como en entrecruzamientos proteína-ADN y en eventos de reparación por escisión incompleta de células individuales. Además es reproducible en tejidos y

órganos de diferentes especies animales incluyendo al humano. Es considerado como una herramienta para evaluar daño mutagénico y genotóxico por estrés oxidante en células humanas *in vivo* e *in vitro*, así como en diversas áreas como el biomonitoreo ambiental. Comparado con otras pruebas genotóxicas, presenta como ventajas son que se tienen resultados a corto tiempo y no se necesitan células en proliferación^{8, 9, 10, 11}.

El ensayo cometa fue originalmente desarrollado por Östling & Johansson en 1984 para cuantificar rompimientos de cadena de ADN en células individuales expuestas a radiación ionizante. En los primeros intentos para detectar el daño emplearon un sistema en el cual las células embebidas en un gel de agarosa mostraron un halo de ADN fragmentado alrededor del núcleo, después el ensayo se mejoró, realizando una lisis en una solución detergente neutra y aplicando un campo eléctrico débil para atraer hacia el ánodo los fragmentos de ADN localizados en el núcleo. Como la corriente eléctrica pasa a través del gel, la doble cadena de ADN rota se desenrolla y es arrastrada formando una cauda detrás de la cabeza nuclear, el ADN se tiñó con bromuro de etidio y las células se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia, resultando una imagen parecida a un cometa. Midió la cauda y determinaron la diferencia entre células irradiadas y no-irradiadas, la longitud se incrementó con relación a la dosis de radiación, las condiciones neutras limitaron la utilidad del ensayo ya que fue usado solamente para cuantificar células con y sin daño al ADN.^{5, 8.}

En un intento por superar las limitaciones cuantitativas, Singh et al. en 1988 basados en la electroforesis neutra descrita por Östling & Johansson introdujeron

la versión alcalina, aumentando el pH a 13 y el contenido de sales en la electroforesis para detectar rompimientos de una cadena de ADN y en sitios alcalilábiles en células individuales, las condiciones alcalinas causaron la desnaturalización del ADN e hicieron el ensayo más sensible a la fragmentación de una sola cadena, midieron la longitud de la cauda con la misma longitud de migración tenían diferente intensidad en la cauda.¹²

El ensayo cometa alcalino fue aceptado por el panel internacional Work shop on Genotoxicity Test Procedures como la versión optima, para evaluar sustancias genotóxicos, carcinogénicas, antineoplásicas y apoptóticas¹³. En los últimos años la electroforesis unicelular alcalina ha sido una excelente herramienta ya que permite la valoración de daño genético in vitro e in vivo en gran variedad de células y tejidos de animales y plantas.

Para evaluar el daño al ADN por medio del ensayo cometa se usan varios valores, determinación del porcentaje de células con cometas, para el cual se categorizan los cometas de 0 a 4, nivel 0 no hay daño, nivel 4 máximo daño (ver ilustración 1 en anexo), el uso de un sistema de análisis de imagen que determina longitud de la cauda (migración de los fragmentos de ADN) porcentaje del ADN en la cauda y el momento de la cauda.⁹

Importancia de los anfibios como modelo animal de investigación genotóxica

A nivel mundial las poblaciones de anfibios en su hábitat natural están experimentando masiva mortandad que han llevado a la extinción de unas 168 especies en las últimas décadas. Para hacer frente a estos descensos, las instituciones zoológicas están desempeñando un papel importante en el establecimiento de colonias cautivas para proteger las especies en peligro de extinción. Muchas de las especies amenazadas recientemente colocados en cautiverio no logran reproducirse antes de su muerte, y el mantenimiento de los anfibios progenitores se está convirtiendo en un reto. Hay pocos casos de estudios aplicados a estas especies amenazadas o en peligro de extinción. Los anfibios son especies muy susceptibles de ser afectadas por el estrés presente en el ambiente. Como resultado, cuando las poblaciones de anfibios disminuyen en la naturaleza, es una señal de alerta para prevenir daños inminentes en otras especies, incluyendo a los humanos. Los anfibios también son parte primordial de un medio en equilibrio. Además de su valor intrínseco como parte de la naturaleza, tienen un papel importante en la cadena trófica, como predador y presa, manteniendo el delicado balance de la naturaleza. Cuando desaparecen, los efectos perjudiciales son notorios: Los anfibios comen insectos, favoreciendo a la agricultura que se ve afectada por diversas especies de ellos. Por otro lado disminuyen el contagio de infecciones producidas por insectos^{9, 15}.

La piel del anfibio contiene sustancias protectoras contra algunos microbios y virus, que ofrecen posibles curas médicas a varias enfermedades. La piel del anfibio es permeable, lo que le permite beber y respirar a través de ella.

Son particularmente sensitivos a la contaminación del ambiente, desafortunadamente, los contaminantes también entran al cuerpo, lo que hace al anfibio un indicador excepcional de la calidad del ambiente.

Las ranas han tenido un lugar especial en varias culturas humanas por cientos de años; han sido valoradas como agentes de la vida y de la buena suerte.

México es el hogar de más de 372 especies y de aquellas que se consideran endémicas en la tierra, posee > 65%. Los anfibios mexicanos están gravemente amenazados por el cambio climático, ya que alrededor del 80% de las especies endémicas son en realidad micro-endémicas, y la mayoría se encuentran en el sur del país.¹⁵

***Lithobates montezumae* (Rana montezuma)**

Taxonomía

REINO	FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA
ANIMALIA	Chordata	AMPHIBIA	ANURA	Ranidae

Nombre científico: *Lithobates montezumae*

Autoridad: Baird, 1854

Nombre común: Rana montezuma Baird, 1854

Esta especie es nativa de México, se encuentra desde el extremo oeste de Jalisco y Michoacán, al este a través del Estado de México, Morelos D.F. y Tlaxcala hacia el norte a Hidalgo, Querétaro y el sur de San Luis Potosí (ver anexo ilustración 2). La población en algunas áreas se encuentra en disminución. Esta especie prefiere los bosques de pino-encino o roble, a una altura mayor de 2000 m sobre el nivel del mar. Se reproduce en lagos, estanques de agua dulce y en ríos con corrientes tranquilas. La desecación y la alteración de estos nichos ecológicos originales pueden afectar a las poblaciones de esta especie, sin embargo, esta rana parece ser resistente a ciertos niveles de degradación del hábitat, ya que frecuentemente se encuentra cerca de los asentamientos humanos. La acuicultura ha introducido algunos depredadores invasores en su hábitat que incluyen en su dieta renacuajos y juveniles pequeños¹⁶.

La rana montezuma se cosecha para el consumo humano, y esta actividad seguramente afecta a la población.¹⁶

Contaminación por metales pesados en México

Metales pesados

Los metales pesados se definen comúnmente como aquellos que poseen una densidad específica de más de 5 g/cm^3 o que su número atómico es superior a 20. Las emisiones de metales pesados pueden ocurrir por múltiples procesos y rutas, que incluyen el aire, el suelo y las aguas superficiales, que después se integran a los mantos acuíferos y se utilizan en las tierras de cultivo. Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, tanto de origen natural como antropogénico. Son especies químicas muy estables que muestran persistencia ambiental. Mientras que algunos metales son esenciales para los organismos vivos, otros son tóxicos y, dependiendo de la concentración, los compuestos esenciales también pueden llegar a ser tóxicos.¹⁷

Además de los procesos industriales, que utilizan metales pesados, ciertas prácticas en la agricultura contribuyen con este tipo de contaminación cuando se usan plaguicidas y fertilizantes que los contienen, actualmente muchos productos, subproductos y residuos de la industria, contienen sustancias tóxicas como plomo, cadmio, cromo, mercurio y hierro como fuente barata de nutrientes minerales como el zinc y hierro. También la industria minera deja expuestos depósitos minerales o roca de desecho que tiene por resultado la lixiviación de metales pesados. Por otra parte una gran variedad de desechos domésticos como limpiadores, jabones y pinturas contienen metales pesados que van a dar al sistema de aguas

residuales y finalmente al ambiente, provocando altas concentraciones de ellos en algunas regiones.^{17, 18}

Los metales pesados son considerados peligrosos en México, de acuerdo con la NOM-052-ECOL-1993, que es el código de clasificación según las características que poseen los residuos peligrosos.¹⁸

La presencia de metales en aguas no es más que motivo de preocupación, principalmente por sus efectos tóxicos y su bioacumulación en la cadena trófica¹².

Los organismos necesitan en pequeñas cantidades metales esenciales para poder llevar a cabo reacciones catalíticas específicas, ejemplo de esto son algunas enzimas que contienen zinc, y la vitamina B₁₂ que contiene cobalto. Sin embargo a concentraciones que exceden dichos requerimientos, tanto los metales esenciales como los no esenciales pueden perturbar el metabolismo al unirse a proteínas de manera no específica y ocasionar daño oxidativo debido a su capacidad de catalizar reacciones redox. Esto puede traer consecuencias como la desactivación de reacciones enzimáticas esenciales, daño a las estructuras celulares fundamentales (especialmente membrana) y modificaciones al ADN.^{11, 18,19}

Mecanismos de acción tóxica de los metales pesados (Cd, Cr, Hg, Pb y Fe)

La exposición ambiental a metales pesados (Cd, Cr, Hg, Pb y Fe) es muy peligrosa ya que están asociados a un amplio rango de efectos tóxicos en plantas y en animales incluyendo el ser humano²⁰. Los metales como Zn, Cu y Mn son esenciales para los organismos ya que están involucrados en numerosos

procesos biológicos. Sin embargo, cuando son acumulados a niveles elevados producen alteraciones patológicas y a exposiciones crónicas pueden iniciar daño oxidante e interferir con rutas bioquímicas, moleculares y/o celulares.^{21, 22, 23}

A diferencia de otras sustancias tóxicas, los metales no son creados ni destruidos por el hombre. Sin embargo, la utilización humana influye en la potenciación de los efectos tóxicos mediante dos medios de diseminación: transporte ambiental (aire, agua, suelo y alimentos) y la alteración de la forma bioquímica del elemento. Las actividades y procesos involucrados en la minería implican un incremento en la geodisponibilidad de elementos potencialmente tóxicos (EPT). Un ejemplo de esta alteración es la generación de drenaje ácido de mina o de roca. Una consecuencia del incremento de la geodisponibilidad de los EPT en las operaciones mineras es el incremento en su movilidad (contaminación de agua) y en su biodisponibilidad (mayor absorción en organismos expuestos), lo cual implica mayores riesgos para la salud y para los organismos que se encuentran en contacto con metales pesados.^{23, 24}

La exposición a metales pesados ha sido asociada al desarrollo de diversas enfermedades como diabetes, arteriosclerosis, problemas cardiovasculares, neurológicas (Parkinson, Alzheimer) y cáncer (riñón, vejiga, hígado, piel, pulmón, entre otros).^{25, 26}

Los metales pesados entran al organismo a través del aire, agua, alimento y por exposición dérmica. Estos metales son transportados vía torrente sanguíneo a diversos órganos y/o sistemas y atraviesan la barrera hemato-cerebral y hemato-

testicular y son transferidos al hígado donde son metabolizados, son acumulados en tejido adiposo, en riñón y otros órganos ocasionando alteraciones bioquímicas, celulares y moleculares como daño en el ADN, ARN, proteínas y lípidos entre otros²⁶. Los metales pueden atravesar la célula por mecanismos pasivos y activos para ejercer su toxicidad. Las especies de mercurio y arsénico son lipofílicas que fácilmente entran a la célula, pero otros requieren mecanismos de transporte activos vía endocitosis como el cadmio o por difusión pasiva como el plomo. Diversos estudios epidemiológicos han asociado la exposición a EPT con el inicio, progresión y desarrollo de diversas enfermedades incluyendo el cáncer.²⁷

Investigaciones *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los EPT inducen efectos neurotóxicos, inmunotóxicos, genotóxicos, carcinógenos y han mostrado ser disruptores endócrinos entre otros, que pudiera dar lugar a efectos acumulativos y/o sinérgicos. La acción sinérgica o antagónica de los EPT puede potencialmente incrementar sus efectos tóxicos y consecuentemente aumentar el riesgo a la salud de los organismos expuestos. Sin embargo, de todas las poblaciones, los anfibios son más susceptibles genética y bioquímicamente a la exposición a esta clase de genotoxinas ambientales debido a su metabolismo y forma de vida.^{28, 29, 30,31}

Los efectos carcinogénicos de algunos EPT como el arsénico, plomo y níquel han sido establecidos en los seres humanos y en animales experimentales línea p53^{32, 33, 34, 35, 36, 37} La exposición a EPT altera las funciones enzimáticas de la célula que conlleva a las alteraciones de las funciones de los órganos y sistemas, afectando así la salud del organismo. Sin embargo, el daño al mecanismo

molecular después de la exposición a EPT no ha sido completamente clarificado.

38, 39

Las características y efectividad del transporte de membrana de los metales pesados condicionan la expresión de la toxicidad de las sustancias químicas al determinar su tiempo de permanencia junto a sus blancos. Estas características dependen de diversos factores entre los que destaca la hidro o liposolubilidad, la volatilidad y la existencia de mecanismos específicos de transporte. La vida media de los compuestos metálicos en el organismo es variable pero tiende a ser prolongada debido a su afinidad y acumulación en el hueso. Por ejemplo el Pb y el Cd tienen vidas medias mayores a 20 años y son elementos acumulables, mientras que el As y Cr tienen vidas medias de días por lo que no pueden detectarse altas concentraciones. La sangre, orina y pelo son las muestras biológicas más empleadas para medir una exposición o dosis.⁴⁰

La toxicidad de los compuestos metálicos se diferencia de la mayoría de las moléculas orgánicas por depender del elemento metálico en cuestión, aunque, como se ha indicado, la expresión de esa toxicidad depende también de las modificaciones toxico-cinéticas derivadas del tipo de molécula. Por ejemplo, el mercurio orgánico es principalmente neurotóxico por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que, el cloruro mercúrico es nefro-tóxico al eliminarse por el riñón. Entre los elementos metálicos intrínsecamente más tóxicos se encuentran los metales pesados Pb, Hg y el semi-metal As. Otro factor que influye en la toxicidad de los compuestos metálicos es el estado de valencia en que el elemento metálico se encuentra. Los blancos de toxicidad de los metales

son proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, afectando a diversos procesos bioquímicos, membranas celulares y organelos. Los efectos tóxicos de los metales se ejercen, salvo pocas excepciones, por interacción entre el ión metálico libre y el blanco.⁴⁰ A lo largo de su evolución, los organismos han adaptado su maquinaria molecular para reconocer y utilizar los elementos químicos en cuya presencia han evolucionado. El organismo puede manejar los metales como cationes libres y logra diferenciarlos al establecer interacciones que reconocen a cada ion. Esto garantiza la funcionalidad del sistema. Sin embargo, la posibilidad de diferenciar iones se pierde en presencia de dos o más iones distintos con interacciones análogas, lo que permite que iones normalmente ausentes en los sistemas biológicos puedan usurpar distintos sitios de unión y repercutan en el metabolismo celular. Este mecanismo de toxicidad es compartido por diversos metales que resultan tóxicos para el organismo.⁴⁰

Rutas para el transporte de elementos traza en el ambiente

Existen elementos que, aunque presentes en cantidades muy pequeñas en los tejidos, son nutrientes esenciales. Ellos realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento y la reproducción. Su ingesta inadecuada puede dañar la función celular y fisiológica y con frecuencia causar alguna enfermedad. En los animales superiores estos elementos pueden dividirse en esenciales, no esenciales y tóxicos (que a bajas y altas concentraciones pueden interferir con funciones vitales). Los elementos traza se dividen de acuerdo a la frecuencia y a su significación biológica³¹

En 1985, de acuerdo con su frecuencia, los elementos traza incluyen tres metales muy activos: hierro, zinc y cobre. Todos los elementos restantes se consideran como ultra trazas porque se encuentran en concentraciones menores de 20 mg. A continuación se describe la acción genotóxica de los siguientes metales pesados: Pb, Hg, Cd, Fe, y Cr ³⁷.

Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado que por años se ha utilizado en la industria con diversos fines, por lo que tiene una amplia distribución en el ambiente. Esto aunado a su elevada toxicidad, lo ha convertido en uno de los principales contaminantes ambientales con potencial patológico al que está expuesta la biota. Los principales afectados son las poblaciones de seres vivos cercanas a la industria minera, metalúrgica, de elaboración de pinturas, reciclaje de baterías.^{41, 42}

Debido a su elevada toxicidad, la intoxicación aguda por este metal suele ser fácil de detectar gracias a la variedad de síntomas y signos clínicos gastrointestinales, hematológicos, neurológicos y en casos graves, renales. Por el contrario, una intoxicación crónica y de bajo nivel como la que usualmente se encuentra en la población de las ciudades representa un desafío diagnosticarla, ya que sus síntomas y signos suelen ser silenciosos y el grado de afectación puede variar entre los individuos.⁴³ Gran parte de los estragos que causa en la fisiología celular resulta de la sustitución que este metal realiza en diversos cationes polivalentes (calcio, zinc y magnesio, entre otros) en los sitios celulares de unión a iones. La amplia distribución que han tenido evolutivamente estos sitios en la maquinaria

celular y la multiplicidad de funciones fisiológicas que se acoplan a ellos, han dificultado definir los blancos moleculares que de manera directa o indirecta participan en la patogenicidad del plomo. La facilidad con que este metal penetra y se distribuye en el organismo obedece a esta misma propiedad, ya que emplea, entre otros, los mecanismos de transporte para la absorción de calcio, zinc, magnesio y otros metales requeridos por el organismo. Las vías que sigue para su absorción dependen en algunos casos del compuesto específico del mismo, siendo las más significativas las vías digestivas y pulmonares. Una vez en el torrente sanguíneo, la mayor parte se une a proteínas eritrocitarias o plasmáticas quedando una pequeña porción en estado libre. Desde aquí se distribuye al resto de los tejidos donde se acumula en mayor o menor medida.⁴⁴

Entre los sitios proteicos para cationes polivalentes que ocupa el plomo se encuentran los de unión a zinc, por los que si bien tiene una afinidad menor, sigue siendo más alta que la del propio calcio. Pese a ello, dada la amplia distribución e importancia que tienen estos últimos en la fisiología celular, actualmente se considera la sustitución de iones calcio en la maquinaria proteica como el principal mecanismo patogénico de este elemento.⁴³

Por su capacidad para sustituir el calcio y otros cationes divalentes en la maquinaria molecular, los efectos del plomo abarcan prácticamente la totalidad del ambiente celular. Esto permite rastrear sus secuelas desde la matriz extracelular hasta el núcleo. Si bien muchos de estos efectos son producto de la interacción directa de este elemento con el componente celular en cuestión, otros son resultado del mal funcionamiento de procesos más complejos como la regulación

genética, la síntesis de proteínas y el metabolismo energético. En la membrana citoplasmática, además de causar daños peroxidativos en lípidos y proteínas, afecta funcionalmente a proteínas extracelulares de unión a calcio. Entre éstas se encuentran las caderinas, las cuales son moléculas de adhesión intercelular que presentan en su dominio extracelular múltiples sitios de unión a calcio cuya ocupación es necesaria para la estabilidad estructural de la proteína. La unión de Cd^{+2} y probablemente de plomo a estos sitios provoca una alteración conformacional que impide su funcionamiento, a la vez que activa, por medio de su dominio intracelular, diversas cascadas de señalización relacionadas con la expresión genética.^{45, 46, 47}

En la membrana celular, diversos intercambiadores y transportadores de calcio y otros metales divalentes son afectados en mayor o menor medida. Es el caso del DCT1 (Divalent Cation Transporter Molecule 1), transportador usado para la captura celular de metales, y que el plomo puede emplear como vía de entrada al citoplasma.⁴⁸ De acuerdo con la presencia, función y ubicación de las distintas proteínas de unión a cationes, el plomo afecta de manera distinta a los diferentes organelos celulares. Estas afectaciones tienden a acumularlo, ocasionando así, daño en la mitocondria y reduciendo el metabolismo energético celular que favorece la generación de radicales libres.⁴³ La concentración de plomo también inhibe la captura mitocondrial del calcio citoplásmico y favorece la liberación del calcio contenido en este organelo. La apertura del poro de transición mitocondrial y la consiguiente liberación de citocromo C al citoplasma, induce la muerte celular por apoptosis.⁴⁹ La síntesis del grupo hemo, otra tarea de la mitocondria, también

resulta afectada. El retículo endoplásmico es uno de los principales reservorios de calcio en el interior celular. El plomo inhibe el funcionamiento de ATPasas de calcio del retículo, lo que incrementa la concentración citoplásmica del calcio con una consecuente reducción luminal del ion.⁴⁹ Muchas proteínas de señalización y maduración conformacional en el retículo endoplásmico dependen del calcio para su funcionamiento, por lo que la depleción de este ion acarrea alteraciones en su actividad. Asimismo, este metal se puede unir en forma directa a algunas chaperonas reticulares con efectos deletéreos para las proteínas. Es el caso de la chaperona molecular GRP78, requerida para la expresión funcional de diversas proteínas y relacionada con la regulación del proceso apoptótico. En las células expuestas, este elemento se ha observado en la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico y la consecuente activación del sistema UPR (unfolded protein response).⁵⁰

El núcleo es uno de los sitios que más plomo acumulan en el interior celular al unirse este metal con la cromatina y diversas proteínas nucleares.²⁶ Desde hace varios años se ha observado que éste y otros metales pesados tienen efectos carcinogénicos en animales de laboratorio. Entre los trabajadores expuestos a elevados niveles de plomo existe una mayor incidencia de neoplasias. Recientemente se han logrado identificar blancos nucleares de este metal relacionados con la regulación y estabilidad genética. Entre estos blancos destacan los denominados Dedos de Zinc, motivos proteicos encargados de medir la unión al ADN de una afinidad de factores de transcripción y que, para ser funcionales, requieren coordinar en su interior un átomo de zinc que los estabilice

estructuralmente en la conformación adecuada. Cuando el plomo sustituye al zinc en su esfera de coordinación altera la conformación del dominio proteico. Con esto impide su unión al ADN y su funcionamiento como regulador genético.⁵¹ Otro importante blanco nuclear del mismo son los sistemas de reparación del ADN. La nucleasa Ape1 forma parte del sistema de localización y escisión de daños en el genoma celular al eliminar residuos apurínicos/apirimidícos del ADN, una alteración muy común. Este metal se une a la nucleasa Ape1 e inhibe su funcionamiento, lo que permite la acumulación de daños mutagénicos en el genoma.⁵² En este sentido, se ha observado que este elemento puede actuar como un cocarcinógeno al potenciar el efecto de agentes carcinogénicos sobre el ADN. Otros efectos del plomo son la hidrólisis del ARN ⁵³, la inhibición de la pirimidina 5'-nucleotidasa (encargada de degradar el ARN), la interferencia con la señalización por glucocorticoides y la inhibición de enzimas antioxidantes y enzimas relacionadas con procesos biosintéticos de diversas índole⁵⁴.

Mercurio

El mercurio (Hg) es el único elemento metálico líquido y algo volátil a temperatura ambiente. Su forma más frecuente en la naturaleza es como cinabrio, mineral compuesto de sulfato mercúrico (HgS). Se encuentra en tres formas primarias: elemental o metálico en estado de valencia (0), compuestos inorgánicos mercuriosos (1+) y mercúricos (2+) y compuestos orgánicos (alquilo, fenilo, etc.). Está presente en numerosos instrumentos de medida (termómetros, barómetros), interruptores y tubos quirúrgicos especiales, así como en las amalgamas dentarias. Las principales fuentes de contaminantes mercuriales han sido la

actividad minera, residuos industriales de plantas cloro-alkali o de fabricación de vinilo y fungicidas, pinturas antifúngicas, fotografía, pirotecnia, baterías secas y pilas, industrias papeleras y laboratorios médico- veterinarios y dentales. Los compuestos orgánicos son más tóxicos por su mayor capacidad de penetración en el sistema nervioso central.⁵⁵

Cadmio

Los metales como el cadmio (Cd) se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, lo que hace inevitable que se acumulen a través de toda la cadena alimenticia. La fuente principal de este metal para las poblaciones donde no hay contaminación por tabaquismo, es el alimento.⁶²

Esto es muy importante desde el punto de vista toxicológico, ya que este elemento presenta un gran espectro de efectos tóxicos, incluyendo nefrotoxicidad, hipertensión y osteomalacia. Un alto porcentaje de cadmio que penetra al organismo se absorbe y sólo una pequeña parte es excretada (estimándose una vida media de 10 años), lo que ocasiona su depósito en el hígado y riñón, en donde se ha observado que alrededor del 80 % de este metal se encuentra enlazado a ciertas proteínas llamadas metalotioneínas (MT).³⁹

Las rutas de consumo involucran a pulmones, intestinos y piel.⁶³ El complejo cadmio-metalotioneínas es distribuido a varios tejidos y órganos, y al final se absorbe en los túbulos renales.⁶⁴ No existe ningún mecanismo de excreción de este metal en humanos, por lo tanto, se acumula en tejidos. La vida media de

cadmio en la corteza de los riñones es de 20 a 35 años. En humanos, la mayor cantidad de éste se deposita en riñones, hígado, páncreas y pulmones.³⁷

El Cd es capaz de generar directamente radicales libres. Sin embargo, indirectamente induce a la formación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) involucrando al radical superóxido y radicales hidroxilo ⁶⁵. Puede activar proteínas quinasas celulares (proteína quinasa C), que se traducen en una mayor fosforilación de varios factores de transcripción, lo que a su vez conduce a la activación de genes de expresión.³⁷

El mecanismo por el cual el Cd genera radicales libres es el reemplazo del hierro y cobre en diversas proteínas citoplasmáticas y de membrana. Esto aumenta la cantidad de iones libres no ligados o mal quelados de cobre y hierro que participan en el estrés oxidativo vía reacción Fenton.⁶⁶ Los mecanismos tóxicos del mismo no son bien entendidos, pero se sabe que actúa intracelularmente, principalmente vía producción de radicales libres que inducen daño, particularmente a pulmones, riñones, huesos, sistema nervioso central, órganos reproductores y corazón.⁶⁷ Los efectos de exposiciones a este metal en consumo de agua sobre marcadores de estrés oxidativo en tejidos cardíacos de ratas, han demostrado un incremento significativo de lipoperoxidasas, malondialdehído (MDA) y disminución de actividades enzimáticas superóxidodismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa.⁶⁸

El Cd es un potente carcinógeno humano que usualmente provoca cáncer de pulmón, próstata, riñón y páncreas. Fumar de forma sinérgica incrementa los efectos carcinogénicos del mismo.⁶⁹

Hierro

El hierro (Fe) se encuentra en estado ferroso y férrico. Los iones ferrosos son solubles en fluidos biológicos y generan la presencia de oxígeno dañino como los radicales hidroxilo.⁷⁰ Este elemento es el sitio catalítico clave de muchas enzimas y de proteínas transportadoras de oxígeno en las células y es vital para la vida, pero puede ser tóxico cuando se encuentra en exceso. La homeostasis de este metal es un proceso complejo y está relacionada con la hipoxia, anemia e inflamación. Alrededor del 65% del hierro está ligado a la hemoglobina, el 10 % a la mioglobina, citocromos, enzimas y el 25% está ligado al almacenamiento de proteínas, ferritina y hemosiderina. Los procesos celulares de consumo y almacenamiento de Fe son regulados por las proteínas reguladoras del fierro (IRPs, Iron regulatory protein). Diversos estudios han demostrado que la desregulación de la expresión de IRPs puede ser perjudicial e incluso letal.⁷¹

El estado redox de las células es predominantemente dependiente de Fe.⁷² El mecanismo homeostático previene la absorción excesiva del hierro en el intestino proximal y regula la liberación de este metal involucrado en el reciclaje. Los efectos tóxicos del Fe libre son motivados por su capacidad de catalizar a través de la reacción Fenton el daño por la producción de radicales libres (73). Muchos estudios han documentado mutaciones en la enzima superóxido dismutasa, así como la participación de este elemento en la generación de radicales de oxígeno orgánico e inorgánico. Los procesos de la peroxidación lipídica es catalizada por el hierro y da como resultado la formación de radicales peróxidos (ROO). Una vez formados, los radicales peróxidos pueden ser reordenados por la reacción de

ciclización en la cual el producto final del proceso de peroxidación es el malondialdehído (MDA).³⁷

El MDA puede reaccionar con las bases del ADN, guanina, adenina y citosina en forma de aductos M1G, M1A Y M1C.⁷⁴ Se ha propuesto que la exposición del intestino por ingesta de hierro induce estrés oxidante y puede ser determinante para el cáncer en humanos en desarrollo avanzado. Niveles elevados de Fe pueden predisponer enfermedades coronarias e infartos al miocardio. La desregulación de la homeostasis de Fe en el cerebro es un factor clave en eventos neuropatológicos tempranos en la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo estrés oxidante, procesos inflamatorios. La Artritis reumatoide es otra alteración ligada al efecto de las ROS. Este desorden está caracterizado por un bajo total de niveles de hierro en el cuerpo (anemia). Sin embargo, niveles elevados del mismo son encontrados en el fluido sinovial en articulaciones de pacientes con artritis. La modificación permanente del material genético es resultado de los ataques que representan los radicales libres en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento. Los radicales hidroxilos producidos vía acción catalítica del Fe^{+2} (reacción Fenton), son capaces de añadir dobles enlaces a las bases de ADN. Hasta la fecha, se han identificado más de 100 productos oxidados de ADN, el mejor conocido ha sido la 8-hidroxiguanosina (8-OH-G). Los productos oxidados de ADN son mutagénicos y carcinogénicos y representan un buen marcador de estrés oxidante de un organismo.³⁷

Cromo

El cromo (Cr) es uno de los elementos más comunes en la tierra en diferentes estados de oxidación.⁷⁹ Los estados estables más importantes son el ⁰ (metal elemental), ⁺³ (trivalente) y ⁺⁴ (tetraivalente). Los efectos a la salud por toxicidad y/o carcinogenicidad por este elemento están relacionados principalmente al estado de oxidación del mismo en el tiempo de exposición⁸⁰.

El Cr⁺³ es un mineral esencial en la dieta diaria el cual se encuentra en pequeñas dosis, como son en alimentos frescos, incluyendo pan, agua, carne y vegetales⁸⁰. El Cr se requiere para potenciar el metabolismo de insulina y de glucosa. Todos los componentes de Cr⁺⁴, independientemente de su grado de solubilidad en agua, son considerados carcinógenos ocupacionales. Estos compuestos son carcinogénicos en dosis altas, considerado como el más tóxico al Cr⁺³. La carcinogenicidad específica del Cr⁺⁴ es en los pulmones y se requiere alta exposición⁸¹. Se ha propuesto que pequeñas cantidades de Cr⁺³ dentro del canal celular incrementan el proceso intensivo de energía de pinocitosis³⁷. El Cr⁺⁴ es absorbido por el intestino y es eficientemente reducido en sangre y después en el hígado. En los pulmones, así como en el hígado, el Cr es probablemente reducido eficientemente por el glutatión. Por lo tanto, el incremento de riesgo de adquirir cáncer de pulmón es solo cuando la dosis de Cr⁺⁴ es elevada en los mecanismos de defensa celular. La difusión facilitada del Cr, del plasma a los eritrocitos representa un mecanismo de agotamiento de Cr⁺⁴ en el plasma sanguíneo. En los eritrocitos, durante el curso de detoxificación, el Cr⁺⁴ es reducido al estado de

oxidación, formando complejos proteicos de cromo. Este complejo con varios ligandos no puede salir de la célula y regresar al plasma.⁸²

Los procesos de reducción de Cr^{+4} a Cr^{+3} por quelación, generan varios radicales libres que, dependiendo de su sitio de acción, pueden provocar activación o detoxificación celular, generando daño en el ADN.³⁷ Los resultados han mostrado que el ascorbato es el reductor biológico más eficiente del Cr^{+4} . En las reacciones donde se utiliza ascorbato para la reducción celular de Cr^{+4} , se generan niveles altos de cromo-adtos de ADN y se produce una mutación induciendo el daño de ADN.⁸³

Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAPs) representan un gran conjunto de compuestos que surgen como productos secundarios durante los procesos de combustión. Químicamente son los sólidos cristalinos de color blanco-amarillento, cuya solubilidad en agua es prácticamente nula, aunque se disuelven bien en grasas y solventes orgánicos¹¹.

Fuentes de emisión y aplicaciones de los compuestos aromáticos policíclicos.

Generalmente estos compuestos se utilizan únicamente a escala de laboratorio, para la investigación y análisis de otras sustancias, no obstante forman parte del combustible diésel y de productos derivados del alquitrán mineral para la construcción de carreteras.

Los principales focos de liberación de estas sustancias tienen lugar de forma natural, a través de las emisiones producidas por la propia vegetación, y la combustión incompleta de la madera.

A nivel industrial, los procesos metalúrgicos de producción y tratamiento del aluminio y la fabricación de coque y carbones, constituyen las fuentes de emisión de compuestos aromáticos policíclicos más significativas.

Efectos sobre la salud humana y el medio ambiente.

Son sustancias que pueden provocar cáncer, defectos, y mutaciones en el feto si la persona se encuentra expuesta a elevadas concentraciones y durante un tiempo prolongado.

Con respecto a su incidencia sobre el medio ambiente, se trata de una sustancia orgánica persistente y de difícil degradación, por lo que su permanencia en el ambiente puede durar años, afectando seriamente al medio acuático y terrestre.

Está demostrado que estos compuestos pueden provocar cáncer y alteraciones funcionales en los animales, generándoles defectos y malformaciones genéticas.

Fuente: EINECS (European Inventory of Existing Commercial chemical Substances)

Contaminación con hidrocarburos

Debido a que el petróleo se ha encontrado en los océanos y la atmósfera desde largos períodos de tiempo geológico, los hidrocarburos son contaminantes naturales del ambiente.⁸⁹ Por otro lado, las actividades relacionadas con los combustibles derivados del petróleo, tales como, la extracción, el refinamiento, el transporte y su consumo, contribuyen de manera importante a la contaminación por hidrocarburos, tanto por la cantidad de contaminantes vertidos como por su toxicidad.

En México, en la segunda parte de la década de los 70's, la petroquímica básica se convirtió en la actividad con mayor contribución a la contaminación. La producción de fibras sintéticas, resinas, fertilizantes, plásticos, pinturas, pigmentos y gases industriales pasaron a ser las actividades más relevantes por su impacto potencial al ambiente.⁹⁰ México es el noveno país con más reservas probadas de petróleo crudo en el mundo, con 25,425 millones de barriles.

PEMEX produce diariamente un total de 3, 583,000 de barriles de petróleo crudo (promedio hasta agosto 2002)⁹¹. Según el informe 2002 de las auditorías ambientales de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente⁹², en las instalaciones de PEMEX ocurrieron el 57% de las emergencias ambientales que se presentaron a nivel nacional con materiales peligrosos durante el período de 1997 al 2001. Según el mismo informe, los principales eventos de emergencia ambiental presentados durante dicho período fueron los derrames y fugas de compuestos como petróleo crudo, combustóleo, diesel, gasolina, turbosina, gas

natural y amoníaco. En las instalaciones de PEMEX de los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche ocurrieron el 88% de dichas emergencias ambientales. El informe de seguridad, salud y medio ambiente de PEMEX 2001, reporta que PEMEX generó un total de 1, 250,507 toneladas de emisiones y descargas de los cuales 76.75% fueron emitidas al aire, 0.34% fueron descargadas en agua, 22.27% generaron residuos peligrosos y 0.64% fueron generadas en fugas y derrames de hidrocarburos⁹¹.

Aunque PEMEX ha obtenido 50 certificados de industria limpia, estas medidas son de reciente aplicación, después de 1988 año en que se aprobó la LGEEPA.

Específicamente para la generación de sustancias tóxicas existe la Norma Oficial Mexicana NOM-052-ECOL-1993⁹³ que establece las características de dichos residuos peligrosos así como los criterios de toxicidad para clasificar a un residuo como peligroso. Mientras que, la norma oficial mexicana NOM-117 ECOL-1998⁹⁴, establece las especificaciones de protección ambiental para la instalación y mantenimiento mayor de los sistemas para el transporte y distribución de hidrocarburos y petroquímicos en estado líquido y gaseoso, que se realicen en derechos de vía terrestres existentes, ubicados en zonas agrícolas y ganaderas.

Contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos

La familia de los HAP consiste en moléculas que contienen carbono e hidrógeno únicamente, generalmente son sólidos. Están formados por 2 o más anillos aromáticos. Los HAP son particularmente considerados como contaminantes comunes de sedimentos y suelos.⁹⁵

La formación de HAP se lleva a cabo en atmósferas donde prevalecen las condiciones de oxígeno insuficientes para la combustión, la cantidad de HAP formada depende de la temperatura y de la naturaleza del material orgánico quemado. Sin embargo, sin importar el tipo de material, a temperaturas definidas se forma proporciones similares de HAP. También provienen de la formación geológica de los combustibles fósiles. En la combustión del petróleo y carbón algunos HAP son liberados sin cambios en emisiones y algunos son transformados en otros HAP. Los mecanismos de formación durante la combustión incompleta de materia orgánica han sido ampliamente estudiados. Dos reacciones están involucradas, la pirólisis y la pirosíntesis. A altas temperaturas, los compuestos orgánicos son parcialmente fragmentados a moléculas más pequeñas e inestables liberando energía (pirólisis).

Estos fragmentos, principalmente radicales, se recombinan para formar hidrocarburos aromáticos que son moléculas más grandes y relativamente estables (pirosíntesis)⁹⁵.

La presencia de HAP en aguas superficiales indica la presencia de una fuente de contaminación (generalmente puntual) ya que, dada su baja solubilidad y su

afinidad a quedarse adsorbidas en las partículas suspendidas, las concentraciones de HAP en agua no son altas. El nivel de HAP en aguas no contaminadas está en un rango de 0 a 5 ng/L. En agua potable, los HAP más comúnmente detectados son fluorantreno, fenantreno, pireno y antraceno, siendo el más persistente el fluorantreno.⁹⁶ La principal fuente de contaminación del agua potable con HAP son los recubrimientos utilizados contra la corrosión en las tuberías de distribución. Sin embargo, en algunos ríos localizados lejos de puntos altamente industrializados se han detectado concentraciones de hasta 50 ng/L. Estas concentraciones han sido atribuidas a la abrasión y lixiviado de la capa de alquitrán que es utilizada periódicamente para prevenir la corrosión de embarcaciones. El lixiviado de los HAP de suelos contaminados a aguas subterráneas no es considerable, debido a que los compuestos permanecen preferentemente adsorbidos en la materia orgánica del suelo. Sin embargo, en suelos altamente contaminados, los HAP pueden alcanzar las aguas superficiales, encontrándose concentraciones de hasta 10 µg/L ⁹⁶.

Los HAP también se encuentran asociados a las partículas suspendidas menores a 10 µm que son de los principales indicadores de la contaminación atmosférica. Los HAP se encuentran en los aerosoles atmosféricos en fase vapor (HAP con dos anillos), en fase vapor-partícula (tres y cuatro anillos) y en la fase particulada (HAP con cinco o más anillos) Amador-Muñoz, *et al* 2001. En ausencia de industria u otras fuentes de contaminación, los HAP en la atmósfera son emitidos por la calefacción residencial y el tráfico vehicular. Concentraciones elevadas de HAP (fluorantreno, benzo[b]fluorantreno, pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno y

fenantreno) han sido observadas en agua de lluvia y especialmente en nieve y niebla⁹⁶.

Esto es resultado probablemente de la adsorción de los compuestos en las partículas suspendidas en el aire, que son finamente depositadas durante las precipitaciones pluviales⁹⁶.

La industrialización creciente de la sociedad y el amplio uso de los combustibles derivados del petróleo han provocado un incremento en la presencia ambiental de los HAP. Algunas fuentes antropogénicas de HAP son la combustión de carbón, las centrales eléctricas, quemadores abiertos, los gases de combustión de los automóviles, algunos procesos industriales y las actividades de extracción, transformación, transporte y combustión de combustibles fósiles. En países desarrollados, la calefacción residencial y el tráfico de vehículos son las principales fuentes emisoras de HAP al aire⁹⁶.

Antraceno

El antraceno fue descubierto en 1832 por Antoine Laurent y Jean Dumas a partir del alquitrán. Por oxidación del antraceno Laurent consiguió en 1836 la primera síntesis de la antraquinona y del ácido ftálico⁹⁶.

El antraceno es un hidrocarburo aromático policíclico. A temperatura ambiente se trata de un sólido incoloro que sublima fácilmente. El antraceno es incoloro pero muestra una coloración azul fluorescente cuando se somete a la radiación ultravioleta⁹⁶.

Aunque el antraceno es un sistema completamente aromático el anillo central muestra también reactividad de dieno siendo susceptible de reacciones Diels-Alder. El anillo central también es más fácilmente oxidable o reducible, debido a la acción de los dos átomos centrales que conservan dos anillos fenílicos con su sistema aromático intacto y por esta situación es energéticamente más favorable⁹⁶.

El antraceno se obtiene como en el siglo XIX del alquitrán o se puede sintetizar a partir de benzoquinona y 1,3-butadieno y reducción de la antraquinona con zinc. Rutas alternativas pasan por el anhídrido del ácido ftálico y benceno en reacción Friedel-Crafts o por deshidratación de la 2-metil-benzofenona⁹⁶.

Aplicación

Casi todo el antraceno es oxidado para dar antraquinona y por lo tanto sustancia de partida en la síntesis de una amplia gama de colorantes como la alizarina. Además se utiliza en la síntesis de algunos insecticidas, conservantes, etc⁹⁶.

a-Benzopireno

El a-benzopireno pertenece a una clase de hidrocarburos aromáticos y que comparten una estructura química básica, el anillo de benceno. Son compuestos poco solubles en agua por tener propiedades hidrofóbicas consistentes en 2 o más anillos bencénicos, ya sea en forma simple o múltiple, formando cadenas o racimos. Ejemplos de hidrocarburo policíclico aromático son el naftaleno, el acenaftileno, el 1,8-Etilennafteno, el 2,3-Bencindeno, el Fenantreno, el Antraceno, el 1,2-Benzofenantreno y el antraceno.

En especial, el a-benzopireno es uno de los derivados de mayor factor de riesgo, tras largos periodos de consumo, puede desencadenar desórdenes celulares produciendo cáncer.

Esta considerada la novena sustancia más peligrosa debido a su potencial tóxico en la salud humana por la Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act of Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA.

El a-benzopireno se produce por condensación de cinco anillos de benceno durante los procesos de combustión a temperaturas de 300 a 600 °C (incendios forestales, carbón, petróleo, grasas), en especial cuando estos son parciales. El consumo de tabaco y la yerba mate son una fuente de benzopireno, así como algunos procesos industriales y algunos alimentos.

Una gran variedad de estos compuestos orgánicos no volátiles pueden ser encontrados en el petróleo contaminante del suelo, en donde los niveles de éstos varían, pero generalmente altas concentraciones pueden ser encontradas en los derrames de hidrocarburos

Hipótesis

Si existen metales pesados (Cd, Cr, Hg, Pb y Fe) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (antraceno, Fenantreno, Benzopireno, Pireno y flourantreno) en el río Tula, se detectará daño al ADN en las células hemocíticas de la rana *Lithobates montezumae*.

Objetivo general

Detectar el daño en el ADN de los hemocitos de renacuajos de la rana *Lithobates montezumae*, mediante el ensayo cometa alcalino, así como evaluar las concentraciones de metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos en el agua del río Tula por Espectroscopia de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente y cromatografía de alta resolución (HPLC)

Objetivos específicos

Cuantificar la frecuencia de cometas (núcleos con daño al ADN) y la longitud de la cauda del cometa (fragmentación del ADN) en 100 hemocitos de renacuajos de la rana *L. montezumae*.

Detectar metales pesados (Cd, Cr, Hg, Pb y Fe) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (antraceno, Fenantreno, Pireno y Flourantreno) en el agua del hábitat de los renacuajos de la rana *Lithobates montezumae* por Espectroscopia de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente y cromatografía de alta resolución (HPLC)

Material y métodos

Se realizaron pruebas de pH, temperatura y conductividad eléctrica, para determinar propiedades fisicoquímicas del agua del río Tula.

El pH en el agua del río Tula y manantial se determinó con un equipo Orion 960 autochemistry system equipado con un electrodo Metrohm 6.0204.100, pH de 0-14 (KCl 3M).

El oxígeno disuelto se determinó con el 3200 Conductivity Instrument YSI equipado con una celda ($K = 1.0$ /cm). (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio, USA).

Se colectaron 3 muestras por triplicado de agua del río de Tula del hábitat de los renacuajos de la rana verde *Lithobates montezumae*, en el sitio de biomonitorio en diferentes niveles.

En el laboratorio de Química Atmosférica, se llevaron a cabo las técnicas: análisis de metales pesados por Espectroscopia de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente e hidrocarburos aromáticos policíclicos por HPLC, en las muestras de agua del hábitat de los renacuajos de la rana verde *Lithobates montezumae*.

El análisis de metales pesados se realizó por Espectroscopia de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente ó ICP por sus siglas en inglés. Usa otro tipo de descargas eléctricas, llamadas plasmas, y han sido usadas como fuentes de atomización/excitación. Estas técnicas incluyeron el plasma inductivamente

acoplado y el plasma acoplado directamente. El plasma es generado por el gas argón que es el comburente y el gas nitrógeno que es un acarreador, adicionalmente es asistido por un gas de corte que es aire.

El ICP permite analizar por efectos de ionización en elevadas temperaturas de plasma (8.000 °K) inducido en campo magnético de argón casi la totalidad de la tabla periódica exceptuando sodio, potasio y gases nobles.

Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. Los disolventes más utilizados en la fase normal, son el agua, el metanol y el acetonitrilo. (Descrito en el método 610 de la Agencia de Protección Ambiental de los EUA).

Selección de los organismos en el área de estudio. Se capturaron 100 renacuajos de la rana *L. montezumae*, en el río Tula en Mixquiahuala Hgo. México (20°13'52" de latitud norte y 99°12'47" de longitud oeste del meridiano de Greenwich y a una altura de 2100 metros sobre el nivel del mar), (ver anexo ilustración 3), Las características físico-químicas del agua del río Tula se detectaron en el período de muestreo de los renacuajos de *L. montezumae* y son las siguientes: temperatura promedio del agua , 19.92 °C en el río Tula, los valores de pH variaron de 6.8 a 7.57, el oxígeno disuelto varió de 7.5 a 8.2 mgL⁻¹.y Las características físico-químicas del agua de manantial donde se tomaron las muestras control negativo en renacuajos *L. montezumae*, la temperatura promedio del agua fue de 21.67 °C en el río Tula, los valores de pH variaron de 6.55 a 6.99, el oxígeno disuelto varió de 7.8 a 8.6 mgL⁻¹.

Los organismos se colectaron con una red no invasiva y fueron seleccionados considerando el mismo estadio de desarrollo, método que ha mostrado ser imparcial y muy eficiente durante esta época del año.

Toma de la muestra sanguínea.

Se sumergieron lotes con diez individuos cada uno en una pecera con temperatura del agua entre 23 °C a 13 °C, para inmovilizarlos se utilizó papel absorbente húmedo, para evitar la deshidratación y daño a los organismos. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal con jeringas heparinizadas y por punción venosa e inmediatamente se realizó una dilución 1:1 con agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37 °C para realizar el ensayo cometa alcalino.

Ensayo cometa alcalino (electroforesis unicelular alcalina)

Se realizó una mezcla con hemocitos de los renacuajos y se les adicionaron 90 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (0.5 % LMPA, Gibco) a 37 °C que fue colocada en un portaobjetos esmerilado con una monocapa de agarosa normal (NMA 1% Gibco) y un cubreobjetos y mantenido a 4° C durante 5 minutos. Posteriormente se retiró el cubreobjetos. Se realizaron dos laminillas por cada muestra, así como para cada organismo del grupo testigo. Los portaobjetos con las células se colocaron en una solución de lisis final recién preparada (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisma-base pH 10), aforada a 100 ml con 1 % Tritón-X y 10 % DMSO10% en vasos couplin a 4 °C por 1 hora. Posteriormente, los portaobjetos fueron colocados en la cámara de electroforesis y se cubrieron con amortiguador alcalino frío [NaOH (300 mM) + 1 mM EDTA] a pH 13.0 (esto es para desenrollar el ADN) a temperatura ambiente por 20 minutos. La electroforesis se realizó a 300 mA y 25 Volts durante 20 minutos. Después los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante Tris (0.4 M pH= 7.5) por 5 minutos. Las laminillas fueron fijadas con metanol absoluto frio por 10 min para su posterior análisis genotóxico. Todo el método se realizó con luz amarilla. Los geles de todos los lotes expuestos, así como, los testigos, fueron codificados con clave conocida para el observador, teñidos con bromuro de etidio (20 μ g/mL) para examinar el daño sobre el ADN con un objetivo micrométrico a 40X (1 unid = 2.41 μ m), en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Zeiss fluorescent), equipado con filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se analizaron dos valores, indicadores de daño al ADN: a) la frecuencia de células con y sin daño al

ADN (con y sin cometa) (50 núcleos en cada gel); b) la longitud de la cauda del cometa en micrómetros (μm) (de la región nuclear terminal hasta el final de la cauda) en 100 núcleos consecutivos (5, 6, 7, 10).

Método estadístico.

Las variables en estudio fueron frecuencia media de cometas (núcleos con daño en el ADN), longitud de la cauda (μm) y concentraciones de HAPs y metales pesados del agua (ppm). (Control negativo y río Tula).

Para evaluar la frecuencia de medias (de núcleos con daño en el ADN), se utilizó **t** de Student en sus modalidades: Comparación de la Medias de dos poblaciones, para las diferencias entre los grupos Control negativo y Grupo expuesto al agua contaminada del río Tula; Y prueba de una Media contra un Parámetro supuesto para determinar si había concentraciones que determinaran contaminación de metales pesados.

El estudio de asociación entre el daño en el ADN (longitud de la cauda, μm) y las diferentes concentraciones de cada uno de los metales pesados se realizó mediante Regresión Lineal Simple.

Resultados

Ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina

Al evaluar los daños al ADN se observó diferencia altamente significativa entre los hemocitos de los ajolotes que habitan en el agua del río Tula y el grupo control ($p < 0.0001$). Donde la frecuencia media de núcleos con daño al ADN, fue de $64.0 \pm 2.0 \mu\text{m}$ y la longitud de la cauda promedio fue de $36.53 \mu\text{m}$ para el grupo del río Tula y la frecuencia media de núcleos con daño al ADN fue de $8.5 \pm 2.0 \mu\text{m}$ en el grupo control. Su longitud promedio de la cauda fue de $2.65 \mu\text{m}$ (ver cuadro 1 en el anexo). Así que de lo anterior se puede observar que los niveles más altos de daño al DNA se encontraron en los individuos expuestos a la contaminación (río Tula).

Detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos

En la evaluación y cuantificación de HAPs en el agua del río Tula, los resultados que mostró el análisis por HLPC de alta resolución, son irrelevantes en la muestra de agua del manantial donde habita el grupo control, al igual que en el análisis del agua del río Tula, por lo tanto no se realizó Regresión Lineal Simple para estos resultados.

Detección de metales pesados

En la evaluación de los valores de metales pesados obtenidos; en el agua del río Tula; se observó que éstos, rebasaron la norma oficial mexicana ($p < 0.05$) NOM-001 ECOL-1996 (ver anexo, cuadro 2). En el análisis del agua del río Tula sobresalen cinco metales pesados que son los siguientes Cr, Cd, Hg, Pb, y Fe la presencia de estos contaminantes es causa de genotoxicidad y citotoxicidad en la biota expuesta.

Las concentraciones observadas en el presente estudio se muestran en el cuadro en el anexo cuadro 2.

Genotoxicidad

Para evaluar la genotoxicidad causada por los contaminantes (Cr, Cd, Hg, Pb y Fe) disueltos en el río Tula sobre el ajolote *L. montezumae*, se evaluó mediante coeficiente de regresión lineal, el daño sobre el ADN medido en longitud de la cauda (μm) y la relación con la concentración en ppm de los metales pesados.

Se observó que por cada unidad, mg/L, que aumenta el **cadmio**, la longitud de la cauda (daño al ADN) aumenta en promedio 182.7 μm .

El daño del ADN aumenta en promedio 81.5 μm por cada unidad mg/L que aumenta el **hierro**.

En el caso de **mercurio** por cada unidad mg/L que aumenta este metal, el daño del ADN aumenta en promedio 69.9 μm .

Y por cada unidad mg/L que aumenta el **chromo**, el daño del ADN aumenta en promedio 47.1 μm .

Finalmente en cuanto al **plomo** se observó que el daño del ADN aumenta en promedio 19.40 μm por cada unidad mg/L que este metal aumenta en el agua.

Para todas las regresiones lineales anteriores ($p < 0.00001$) y el coeficiente de determinación (r^2) en cada caso fue de 0.97.

Discusión

Como ya se observó en los resultados, el agua del río Tula se puede considerar realmente contaminada de cromo (0.725 mg/L), cadmio (0.187 mg/L), mercurio (0.487 mg/L) plomo (1.753 mg/L) y fierro (0.422 mg/L) ($P < 0.0001$). Resultados que concuerdan con Montelongo *et. al.*, en 2007 en su estudio de Modelación de la calidad del agua del río Tula, estado de Hidalgo, México. Donde Montelongo encontró que los altos niveles de metales pesados, en el río Tula pueden atribuirse a la industria química, cementera, agricultura y las aguas residuales de drenaje de agua que pasa directamente a la presa Requena a través de un sistema canales de drenaje. Teniendo en cuenta que la presa es una cuenca cerrada y en vista de la amplia evaporación del agua, la acumulación de contaminantes químicos aumenta en todos sus componentes, especialmente durante la temporada de verano, donde las tasas de evaporación alcanzan valores máximos y la formación de complejos de tales iones metálicos conduce a la fragmentación del ADN.

De acuerdo con lo anterior se concluye que la contaminación observada en este estudio es considerable. En el presente estudio se observó esta contaminación provocó daño en el ADN de la rana montezuma lo que concuerda con los resultados obtenidos por Mouchet *et. al.*, en 2006 en su estudio de biomonitorio con ensayo cometa y pruebas de micronúcleos en larvas de anfibios (*Xenopus laevis*) y ensayo de Ames (pruebas bacterianas Ames Mutatox ®) quienes observaron daños también en los núcleos.

Los datos obtenidos mostraron que las frecuencias de cometas (núcleos con daño en el ADN) para la población del río Tula fueron significativamente mayores. Los niveles más altos de daño al DNA se observaron en los individuos expuestos a la contaminación (río Tula) de $(64.0 \pm 2.0 \mu\text{m})$ y la longitud de la cauda promedio fue de $36.53 \mu\text{m}$, ($P < 0.0001$) comparado con la población control de $8.5 \pm 2.0 \mu\text{m}$ y la longitud promedio de la cauda fue de $2.65 \mu\text{m}$. Lo que indica que cuanto mayor sea la cola que refleja el ensayo, mayor es el daño en el ADN, que se explica como fragmentación del ADN como lo observó Xiao Hui Yin *et. al.* que en 2009 reportan que a mayor concentración de cadmio mayor es el daño al ADN en eritrocitos y hepatocitos del sapo bufo (*Bufo bufo gargarizans*) expuesto al contaminante, En el presente estudio además se encontró relación lineal significativa entre las ppm de los metales pesados (cadmio, Cromo, mercurio, Plomo y fierro) y en daño en el ADN.

De acuerdo con Mouchet *et. al.*, 2006., Frenzilli *et. al.* 2009 y Wael *et. al.*, 2012. El daño en el ADN detectado en este estudio podría haberse originado a partir de roturas de ADN de una sola hebra, roturas de doble cadena, formaciones de aductos ADN-ADN y ADN-proteína, enlaces cruzados resultantes de la interacción con metales pesados o sus metabolitos con el ADN. Como lo menciona Nwani *et. al.* en 2009 en sus estudios de efectos mutagenicos y genotóxicos en el pez de agua dulce *Channa punctatus*. Por lo tanto el daño causado por metales pesados, observado en esta investigación, se considera como un tipo de lesión potencialmente mutagénico y genotóxico.

Conclusiones

- Las concentraciones de metales pesados en el agua del río Tula es alarmante por que sobre pasa los niveles de referencia.
- Los metales pesados (Cr, Cd, Hg, Pb y Fe) encontrados como contaminantes en el agua del Rio Tula causaron daño al ADN en los individuos expuestos.
- El daño en el ADN medido por la longitud de la cauda en el ensayo cometa está asociado directamente con la concentración, ppm, de los metales: Cr, Cd, Hg, Pb y Fe en las aguas consideradas contaminadas.
- El daño causado por metales pesados, observado, es un tipo de lesión potencialmente mutagénico y genotóxico.
- La aplicación del ensayo cometa en hemocitos de *L. montezumae* en la evaluación de los contaminantes genotóxicos, proporciona información de campo valiosa, para estudios de biomonitoreo y contaminación ambiental.
- Los hemocitos de la *L. montezumae* pueden responder con alta sensibilidad a un agente genotóxico, por lo tanto puede ser utilizada como organismo centinela en los estudios ecotoxicológicos de los lugares que sean su hábitat, para detectar concentraciones peligrosas de metales pesados con el propósito de evitar que estas comunidades humanas locales se vean afectadas en la salud y también poder detectar de manera temprana problemas ambientales acuáticos.

- Los resultados obtenidos en este estudio nos hacen manifestar a los distintos esfuerzos gubernamentales y privados, para tomar acciones en soluciones viables, como el biomonitoreo ambiental y hacer útil las herramientas los daños ocasionados por los xenobioticos, como es el caso del río Tula.

Referencias

1. FRENZILLI G., NIGRO M., LYONS B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments Review Article Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Volume 681, Issue 1, January–February 2009, Pages 80-92
2. Comisión Nacional del Agua (2007): Acerca de la Cuenca del Valle de México:
http://www.cna.gob.mx/ecna/español/regional/gravamex/publicaciones/ante_cuenca_gravamex.htm [9 de octubre de 2012 14:20].
3. CALDERÓN-SEGURA M.E., GÓMEZ-ARROYO S., VILLALOBOS-PIETRINI R., MARTÍNEZ-VALENZUELAC., CARBAJAL- CARBAJAL-LÓPEZ Y., CALDERÓN-EZQUERRO M C., CORTÉS-ESLAVAJ., GARCÍA-MARTÍNEZ R., FLORES-RAMÍREZD. RODRÍGUEZ-ROMERO MI., MÉNDEZ-PÉREZ P., BAÑUELOS-RUÍZ E. 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. Journal of Toxicology. 11, 1-11
4. CALDERÓN-SEGURA M. E., GÓMEZ-ARROYO S., VILLALOBOS-PIETRINI R., BUTTERWORTH FM., AMADOR-MUÑOZ O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organo chemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. Mutat. Res. 558, 7-1.

5. MOUCHET F., GAUTHIER L., MAILHES C., JOURDAIN M.J., FERRIER V., TRIFFAULT G., DEVAUX A.. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests) Original Research Article Science of The Total Environment, Volume 355, Issues 1–3, 15 February 2006, Pages 232-246
6. MARTINEZ V. C. GOMEZ A. S. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas, (2007) Rev.Int. Contam. Ambient. 23 (4):185-200.
7. OSTROSKY P., GONSEBATT M. E. El tejido linfocitario en la evaluación de marcadores de efecto, (2006) Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
8. SCHNURSTEIN A., BRAUNBECK T. Tail Moment versus Tail Length Application of an In Vitro Version of the Comet Assay in Biomonitoring for Genotoxicity in Native Surface Waters Using Primary Hepatocytes and Gill Cells from Zebrafish (*Danio rerio*) Original Research Article Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 49, Issue 2, June 2001, Pages 187-196
9. STEVEN R., PETRAS M. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay Original Research Article Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 413, Issue 3, 30 March 1998, Pages 235-250

10. BANERJEE P., TALAPATRA S. N., MANDAL N., SUNDARAM G., MUKHOPADHYAY A., SUDIP D., BANERJEE K.. Genotoxicity study with special reference to DNA damage by comet assay in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* exposed to drinking water Food and Chemical Toxicology, Volume 46, Issue 1, January 2008, Pages 402-407
11. HUANG D, ZHANG Y, WANG., ZHUOYIXIE Y, JI W. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China Original Research Article Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 629, Issue 2, 18 May 2007, Pages 81-88
12. LACAZE E. DEVAUX A. MONS R. BONY S. GARRIC J. GEFFARD A. GEFFARD O. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment Original Research Article Environmental Pollution, Volume 159, Issue 6, June 2011, Pages 1682-1691
13. COLLINS A. 2002, the comet assay, principles, applications and limitations: methods in molecular biology, in situ detection of DNA damage: methods and protocols. Human press Inc. Totowa, Nueva Jersey Vol. 203, 163-177.
14. BURLINSON B. TICE R. R., SPEIT G. AGURELL E. SUSANNE Y. BRENDLER-SCHWAAB, COLLINS A. R., ESCOBAR P., HONMA M., KUMARAVEL T. S., NAKAJIMA M., SASAKI Y. F., THYBAUD V., UNO Y., VASQUEZ M., HARTMANN A.. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup Original

- Research Article Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 627, Issue 1, 3 February 2007, Pages 31-35
15. OCHOA-OCHOA L. M., RODRÍGUEZ P., MORA F., FLORES-VILLELA O., WHITTAKER R. J., Climate change and amphibian diversity patterns in Mexico Original Research Article Biological Conservation, Volume 150, Issue 1, June 2012, Pages 94-102
16. SANTOS B. G., FLORES-VILLELA O. 2004. *Lithobates montezumae*. En: UICN 2011. Lista Roja de Especies Amenazadas. 27 de noviembre de 2011 15:30 www.iucnredlist.org.
17. JÄRUP L., Hazards of heavy metal contamination, Department of Epidemiology and Public Health, Imperial College, London, UK, British Medical Bulletin, Vol. 68, 2003; 68: 167–182
18. KÖFALUSI GK, Aguilar GE, Los productos y los impactos de la descomposición de residuos sólidos urbanos en los sitios de disposición final Gaceta ecológica Vol. 79, 2006, 39-51
19. PALPANDI C., KESAVAN K., Heavy metal monitoring using *Neritacrepidularia*-mangrove mollusc from the Vellar estuary, Southeast coast of India Original Research Article Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Volume 2, Issue 1, Supplement, January 2012, Pages S358-S367
20. SÁNCHEZ-QUEVEDO, M. C., ALAMINOS, M., CAPITAN, L. M., MOREU, G., GARZON, I. CRESPO, P. V. Y CAMPOS, A. 2007. Histological and

- histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissues engineering. *Histol. Histopathol.* 22 (6): 631-640.
21. VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. Y TELSER J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Biochemistry & Cell Biology.* 39(1): 44–84.
22. BALLATORI, N. Molecular mechanisms of hepatic metal transport. En: *Molecular Biology and toxicology of metals.* Ed. R. J. Zalups and J. Koropatnik, London 2000: Taylor & Francis Group. P.p:346-381.
23. COUSINS, R. J. Y MCMAHON, R. J. Integrative aspects of zinc transporters. *Journal of Nutrition.* 2000, 130(5): 1384-1387.
24. ROY, C. N. Y ANDREWS, N. C. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Human Molecular Genetics.* 2001, 10(20):2181–2186.
25. FERGUSSON, J. *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects,* Pergamon Press, 1990, pp 614.
26. VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J. Y TELSER, J. (2006). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266: 37-56.
27. KLAASSEN, C. *Heavy metals and heavy-metal antagonists. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* (1era). MacGraw Hill. Nueva York: 2009, 1851-1875

28. HALLIWELL, B. Y GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal-ions in human disease an overview. *Methods in Enzymology*.1990, 186: 1-85
29. STOHS, S.J. Y BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals-ions. *Free Radical Biology & Medicine*.1995, 18(2): 321-36
30. LEONARD, S. S., HARRIS, G. K. Y SHI, X. L. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004, 37(12): 1921-1942
31. VALKO, M., MORRIS, H. Y CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005, Vol. 12: 1161-1208
32. KALTREIDER, R. C., PESCE, C. A., IHNAT, M. A., LARIVIERE, J. P. Y HAMILTON, J. W. Differential effects of arsenic (III) and chromium (VI) on nuclear transcription factor binding. *Molecular Carcinogenesis*.1999, Vol. 25(3): 219-29.
33. NADIA DANILOVA, KATHLEEN M. SAKAMOTO, AND SHUO LIN, Role of p53 Family in Birth Defects: Lessons from Zebrafish Birth Defects Research 2008, (Part C) 84:215–227
34. HU, Y., JIN X. Y SNOW, E. T. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF- κ B DNA binding activity and related gene expression. *Toxicology Letters*. 2002, 133(1): 33-45
35. EVAN, G. I. Y VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*.2001, 411(6835): 342-348.

36. VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J. Y TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2006, 266: 37-56.
37. JOMOVA, K. Y VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011, 283: 65-87
38. LOFT, S., DANIELSEN, P. H., MIKKELSEN, L., RISOM, L., FORCHHAMMER, L. Y MOLLER, P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society Transactions.* 2008, 36(5): 1071-1076.
39. SMART, R. C. Y HODGSON, E. *Molecular and Biochemical Toxicology.* 2008, 4a. Wiley. U.S.A.
40. BELLINGER, D. C. *Lead. Pediatrics.* 2004, 113:1016-1022
41. MIELKE, H. W. (1999). *Lead in the Inner Cities. American Scientist.* 87(1): (Lidsky y Schneider, 2003)62-73
42. FLOREA, A. M. Y BUSSELBERG, D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals.* 2006, 19(4): 419-427
43. LIDSKY, T. I Y SCHENIDER J. S. (2003). *Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. Brain,* 126:5-19
44. GONDWIN, H. A. (2001). *The biological chemistry of lead. Current Opinion in Chemical Biology.* 5(2): 223/227.
45. CHIA, S. E., YAP, E. Y CHIA, K. S. (2004). *Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and susceptibility of workers exposed to inorganic lead and its effects on neurobehavioral functions. Neurotoxicology.* 25(6): 1041-1047.

46. SAXENA, G., JOSHI, U. Y FLORA, S. J. S. (2005). Monoesters of meso 2, 3-dimercaptosuccinic acid in lead mobilization and recovery of lead induced tissue oxidative injury in rats. *Toxicology*. 214(2): 39-56.
47. ZHAO, Y., WANG, L., SHEN, H. B., WANG, Z. X., WEI, Q. Y. Y CHEN, F. (2007). Association between delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and blood lead levels: a metaregression analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 70(23): 1986-1994
48. BALLATORI, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental Health Perspective*. 110 (5): 689-694
49. HECHTENBERG, S. Y BEYERSMANN, D. (1991). Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase activity by cadmium, lead and mercury. *Enzyme*. 45(3): 109-115.
50. QIAN, Y. Y CASTIGLIONI, T. E. (2003). Lead -induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system. *Neurochemical Research*. 28(1): 153-162.
51. HANAS, J. S., RODGERS, J.S., BANTLE, J. A. Y CHENG, Y. G. (1999). Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2) His(2) zinc finger protein. *Molecular Pharmacology*. 56(5): 982-988.
52. Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium. *Environmental Health Perspectives*. 112(7): 799-804.
53. J. P. Y BOCK, C. W. (1998). Lone pair functionality in divalent lead compounds. *Inorganic Chemistry*. 37: 1853-1867.

54. GOSH, A. Y GREENBERG, M. E. (2000). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. 268 (5208): 223-227.
55. ZALUPS, R. K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacology Reviews*. 52(1): 113-143.
56. HEI, T. K. Y FILIPIC, M. (2004). Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free radicals Biology and Medicine*. 37: 574-581.
57. EVANS, C. D., LA DOW, K., SCHUMANN, B. L., SAVAGE, R. E., CARUSO, J., VONDERHEIDE, A, SUCCOP, P. Y TALASKA, G. (2004). Effect of arsenic on benzo[a] pyrene DNA adducts levels in mouse skin and lung. *Carcinogenesis*. 25(4): 493-7.
58. DING, W., HUDSON, L. G. Y LIU, K. J. (2005). Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 279: 105-112.
59. MANDAL, B. K. Y SUZUKI, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 58: 201-235.
60. WANG, Z. Y ROSSMAN, T. G. (1996). The carcinogenicity of arsenic. In: Chang, T. *Toxicology of metals*. CRC press, Boca Raton. Fl, pp 221-229.
61. Ferrer, A. D (2003). Intoxicación por metales. *Unidad de Toxicología Clínica*. México. 26:141-153.
62. CUYPERS, A., PLUSQUIN, M., REMANS, T., JOZEF CZAK, M. KEUNEN, E., GIELEN, H., OPDENAKKER, K., NAIR, A. R., MUNTERS, E., ARTOIS,

- T. J., NAWROT, T., VANGRONSVELD, J. Y SMEETS, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 23: 927-940.
- 63.HAMER, D. H. (1986). Metallothioneins. *Annual Reviews Biochemistry*. 55(1): 913-951.
- 64.OHTA, H. Y CHERIAN, M. G. (1991). Gastrointestinal absorption of cadmium and metal-lothionein. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 107: 63-72.
- 65.WAISBERG, M., JOSEPH, P. HALE, B. Y BEYESRSMANN, D. (2003). Molecular and celular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192: 95-117.
- 66.PRICE, D. J. Y JOSHI, J. G. (1983). Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions. *The Journal of Bioloical Chemistry*. 258: 10873-10880.
- 67.WAALKES, M. P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 79: 241-244.
- 68.NOVELLI, E. L. B., MARQUES, S. F. G., ALMEIDA, J. A., DINIZ, Y. S., FAINE, L. A. Y RIBAS, B. K. (2000). Mechanism of cadmium exposure on cardiac tissue. *Toxic Substance Mechanisms*. 19: 207-217.
- 69.FLORA, S. J. S., MITTAL, M. Y MEHTA, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal Medical Research*. 128(4): 501-523.
- 70.JONES-LEE, A. Y LEE, G. F. (2006). Role of iron chemistry in controlling the reléase of pollutants from resuspended sediments. *Remediation Journal*. 16: 33-41.

71. DECK, K. M., VASANTHAKUMAR, A., ANDERSON, S. A., GOFORTH, J. B., KENNEDY, M. C., ATHOLINE, W. E. Y EISENTEIN, R. S. (2009). Evidence that phosphorylation of iron regulatory protein 1 at Serine 138 destabilizes the (4Fe-4S) cluster in cytosolic aconitase by enhancing 4Fe-3Fe cycling. *The Journal of Biological Chemistry*. 284: 12701-12709.
72. PARK, H. S., KIM, S. R. Y LEE, Y. C. (2009). Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 14: 27-38.
73. GANZ, T. (2003). Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 102: 783-788.
74. MARNETT, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research- Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 424: 83-95.
75. LINDER, M. C. Y HAZEGH-AZAM, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 63: 7975-8115.
76. SHIM, H. Y HARRIS, Z. L. (2003). Genetic defects in copper metabolism. *Journal of Nutrition*. 133: 15275-15315
77. PROUSESEK, J. (2007). Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 79: 2325-2338.
78. SPESIKY, H., GÓMEZ, M., BURGOS-BRAVO, F., LÓPEZ-ALARCÓN, C., JULLIAN, C., OLEA-AZAR, C. Y ALIAGA, M. E. (2009). Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences

- associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17: 1803-1810.
79. CIESLAK-GOLONKA, M. (1996). Toxic and mutagenic effects of chromium (IV). *Polyhedron*. 15: 3667-3689.
80. VINCENT, J. B. (2010). Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Transactions*. 39:3787-3794
81. SINGH, J., CARLISLE, D. L., PRITCHARD, D. E. Y PATIERNO, S. R. (1998). Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncology Reports*. 5: 1307-1318.
82. ZHITKNOVICH, A. (2005). Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). *Chemical Research in Toxicology*. 18: 3-11.
83. QUIEVRYN, G., PETERSON, E., MESSER, J. Y ZHITKOVICH, A. (2003). Genotoxicity and mutagenicity of chromium (VI) ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry*. 42: 1062-1070.
84. GALANIS, A., KARAPETSAS, A. Y SANDALTZOPOULOS, R. (2009). Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental and Mutagenesis*. 674: 31-35.
85. LISON, D., DE BOECK, M., VEROUGSTRAETE, V. Y KIRSCH-VOLDERS, M. (2001). Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occupational and Environmental Medicine*. 58: 619-625.

86. MAO, Y., LIU, K. J. Y SHI, X. (1996). Generation of reactive oxygen species by Co (II) from H₂O₂ in the presence of chelators in relation to DNA damage and 2'-deoxyguanosine hydroxylation. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 47: 61-75.
87. POURAHMAD, J., O'BRIEN, P. J., JOKAS, F. Y DARAEI, B. (2003). Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 17: 803-810.
88. YUAN, Y., HILLIARD, G., FERGUSON, T. Y MILLHORN, D. E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 15911-15916.
89. CONNELL, D. W. (1997). *Basic concepts of Environmental Chemistry*. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers. 506 pp.
90. JIMÉNEZ C., B. E. (2001). *La contaminación ambiental en México: Causas, efectos y tecnología apropiada*. México, D.F., Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. Noriega Editores. 926 pp.
91. PEMEX (2001). Informe estadístico. www.pemex.com
92. PROFEPA (2002). Informe de emergencias ambientales ocurridas en PEMEX a nivel nacional. 1997-2002.
<http://www.profepa.gob.mx/saa/audita53.htm>
93. DOF (Diario Oficial de la Federación) (1993). 22 de Octubre.
94. DOF (Diario Oficial de la Federación) (1998). 24 de Noviembre

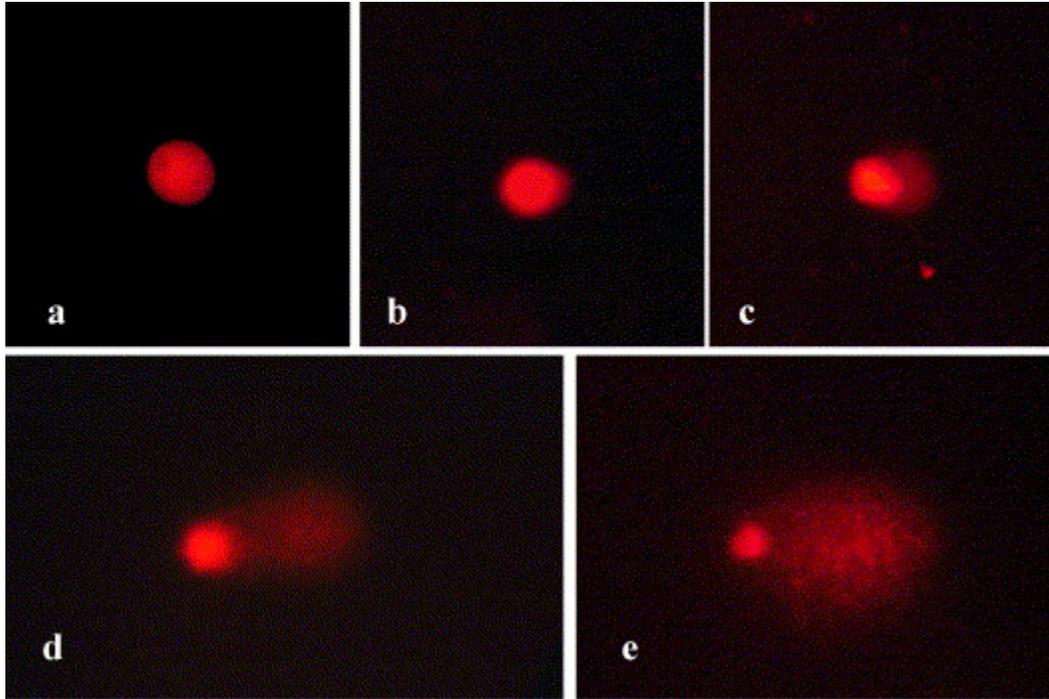
- 95.KANALY, R. A. Y HARAYAMA, S. (2000). Minireview. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol. 182: 2059-2067
- 96.OMS (Organización Mundial de la Salud) (1998). Polynuclear aromatic hydrocarbons. Guidelines for drinking-water quality. <http://www.who.int>
- 97.ÇAVAŞ T., ERGENE-GÖZÜKARA S., Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents Original Research Article Aquatic Toxicology, Volume 74, Issue 3, 10 September 2005, Pages 264-271
- 98.VAN DER O.R., BEYER J., VERMEULEN N. P.E, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review Review Article Environmental Toxicology and Pharmacology, Volume 13, Issue 2, February 2003, Pages 57-149
- 99.BAJPAYEE M., KUMAR P. A., PARMAR D., MATHUR N., SETH P. K., DHAWAN A.. Comet assay responses in human lymphocytes are not influenced by the menstrual cycle: a study in healthy Indian females Original Research Article Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 565, Issue 2, 3 January 2005, Pages 163-172
- 100.YIN X. H., ZHU G. N., LI X. B., LIU S. Y. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test Original Research Article Mutation Research/Genetic

Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 680, Issues 1–2, November–December 2009, Pages 2-6

101. WAEL A. O., KHALID H. Z., ABDEL K. A. A., ABO H. S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats Original Research Article Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 746, Issue 1, 4 July 2012, Pages 7-14
102. MONTE E. L. C., DOS S. P. E., SOUZA DO A. V., BATISTUZZO DE M. S. R., AGNEZ L.L. F Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model for in situ evaluation of genotoxicity in surface water Science of The Total Environment, Volume 408, Issue 23, 1 November 2010, Pages 6042-6046
103. NWANI C.D., LAKRA W.S., NAGPURE N.S., KUMAR R., KUSHWAHA B., SRIVASTAVA S.K. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis Original Research Article Food and Chemical Toxicology, Volume 48, Issue 1, January 2010, Pages 202-208
104. SHEN L., DING H., LI M.Y., LIU Y., CHEN R.J., PU W.W., XU S.X., COLLINS M. An apparatus for studying the response of cultured endothelial cells to shear and normal stresses Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 60, Issue 8, September 2006, Pages 480-481

Anexo

Ilustración1.- Ensayo cometa donde se muestran los diferentes niveles de daño al ADN en núcleos de anfibio.



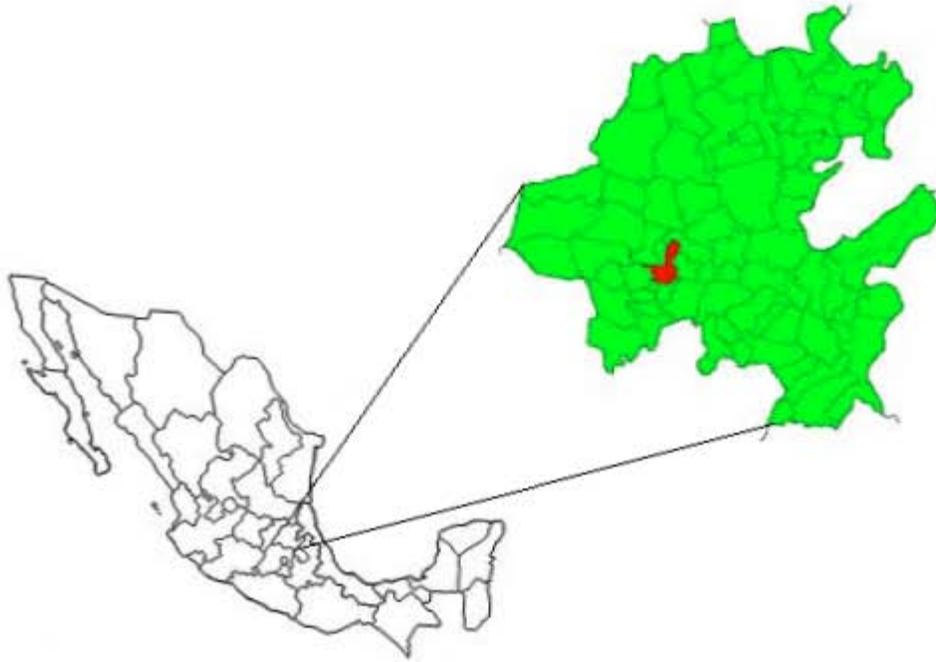
a) Núcleo sin daño, nivel 0. b) Núcleo con daño, nivel 1 c) Núcleo con daño, nivel 2 d) Núcleo con daño, nivel 3 e) Núcleo con daño, nivel 4. Tomado de D. Huang *et. al.* Mutation Research 629 pagina 84, 2007

Ilustración 2



http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/rana_montgw.xml?_httpcache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no

Ilustración3. Ubicación geográfica con color rojo del municipio de Mixquiahuala de Juárez Hidalgo, donde se colectaron y se realizó la toma de muestra sanguínea en ajolotes de la rana *L. montezumae*.



cuadro 1

	TRATAMIENTO	N	media	Desviación estándar	Error estándar
Daño al ADN (longitud de la cauda) μm	CONTROL	100	2.65100	0.726642	0.072664
	EXPUESTOS	100	36.53132**	5.966243	0.596624

**diferencia estadística significativa $P < 0.00001$

Cuadro 2 de valores medios de los metales pesados (ppm) encontrados por espectrometría de absorción atómica en el agua de los mantos acuíferos en estudio y valores óptimos para descarga en medio ambiente según NOM-001-ECOL-1996

Metal	Concentración	Control negativo	Río Tula
Cromo (Cr)	Observado	0.00455	0.7246**
	Óptimo	0.5	0.5
Cadmio (Cd)	Observado	0.00153	0.187**
	Óptimo	0.02	0.02
Mercurio (Hg)	Observado	0.00205	0.487**
	Óptimo	0.01	0.01
Plomo (Pb)	Observado	0.0065	1.7533**
	Óptimo	0.2	0.2
Hierro(Fe)	Observado	0.00646	0.4223**
	Óptimo	0.30	0.30

**diferencia estadística significativa con respecto a los valores óptimos y valores en control negativo