



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTABLECIMIENTO DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE FRENTE A LA COEXPOSICIÓN AGUDA A TOLUENO,  
CLOROFORMO Y DICLOROMETANO, Y SU RELACIÓN CON  
GENOTOXICIDAD**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**Q. JAVIER ALEJANDRO BELMONT DÍAZ**

**TUTOR: DRA. REGINA MONTERO MONTOYA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**JAVIER ESPINOSA AGUIRRE  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM**

**EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Resumen

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son de gran interés en la toxicología, esto se debe a que están incluidos en una amplia gama de artículos (líquidos de limpieza, pinturas, adhesivos, solventes, etc.) y por lo tanto se encuentran diseminados en ambientes intramuros y extramuros, lo cual representa un riesgo a la salud de las poblaciones expuestas. Dicha exposición ha correlacionado epidemiológicamente con enfermedades humanas, por ejemplo, con algunos tipos de cáncer (leucemias, tumores cerebrales, cáncer de tiroides, etc.).

Recientemente se ha descrito una situación compleja que involucra poblaciones humanas expuestas a COV. Dos ríos ubicados en la zona limítrofe de los estados de Tlaxcala y Puebla (México), reciben descargas domésticas e industriales sin previo tratamiento, como consecuencia, se ha deteriorado dramáticamente el ambiente y se han registrado casos de enfermedades en los habitantes de la zona que podrían estar relacionadas con la contaminación en los ríos, como leucemia en menores. En un estudio llevado a cabo en la zona se encontró que los principales contaminantes de los ríos son el cloroformo (CLF), el diclorometano (DCM) y el tolueno (TOL); en este mismo estudio se llevó a cabo un biomonitoreo con los habitantes que viven cerca de las descargas y se encontró un incremento en la frecuencia de micronúcleos (biomarcador de daño genotóxico), lo que sugiere que los contaminantes de los ríos podrían ser responsables del daño en los pobladores.

Los COV encontrados en los ríos (CLF, DCM y TOL) son contaminantes ubicuos que se encuentran en el aire de ambientes urbanos, en industrias y sitios de desecho. Estos COV han sido ampliamente estudiados, se sabe que son absorbidos en los pulmones y son transportados a través del torrente sanguíneo a todos los órganos, produciendo daño principalmente en hígado, riñones y cerebro. Los efectos tóxicos de estos contaminantes están mediados por su biotransformación, la cual se lleva a cabo principalmente por enzimas de citocromo P450 (P450) y glutatión S-transferasas (GST). Los metabolitos resultantes de esta biotransformación son electrófilos que pueden reaccionar con biomoléculas como el ADN y formar aductos. Otro mecanismo de toxicidad que ha sido descrito como un mecanismo secundario de daño a biomoléculas, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales pueden producir daño genotóxico e inducir citotoxicidad.

A pesar de que se conoce mucho del mecanismo de toxicidad de estos COV, los resultados del estudio epidemiológico no pueden ser explicados satisfactoriamente, esto es porque todas las pruebas hechas en animales con los COV individuales son negativas para la prueba de micronúcleos. Este hecho nos llevó a plantear la posibilidad de que pudieran existir interacciones de los COV en mezcla y exacerbar sus efectos tóxicos.

Para comprobar esta hipótesis, se propuso un diseño de exposición aguda (1 y 3 días), en donde se expusieron ratas jóvenes a CLF, DCM y TOL por separado y en mezcla. Una vez terminada la exposición, se evaluaron parámetros de metabolismo de xenobióticos (P450, CYP2E1, GST, GSTT1), estrés oxidante (GSH/GSSG, TBARS, enzimas antioxidantes), genotoxicidad (MNPCE, MHEP) y citotoxicidad (%PCE, índice mitótico).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran como los parámetros de metabolismo, estrés oxidante, genotoxicidad y citotoxicidad tienen comportamientos concertados. Por un lado cuando la defensa antioxidante puede contender con la exposición, existe una inducción en el metabolismo de xenobióticos, la proliferación celular es normal y existe una tendencia a que la genotoxicidad incremente. Por otro lado cuando la defensa antioxidante se rebasa, el metabolismo de xenobióticos se deprime y se observan más eventos citotóxicos que genotóxicos. Otro aspecto importante observado en el estudio, es que los compuestos administrados por separado no muestran el comportamiento obtenido en mezcla, por lo que se refuerza la hipótesis de la existencia de interacciones entre estos VOCs.

El caso de los ríos Atoyac y Xochiac es sólo una muestra de la realidad que viven los ríos en nuestro país, el deterioro ecosistémico es tan grave que rebasa a todas las pruebas científicas que se pudieran aportar en torno a este caso. Es urgente que las autoridades responsables de velar por la integridad de estos espacios, asuman su compromiso ético y legal para detener y

revertir el impacto que la actividad industrial y doméstica ha tenido sobre la integridad de los ríos y el bienestar de sus habitantes.

## Abstract

Volatile organic compounds (VOCs) are of major concern because they have a broad range of uses like extractants, dry-cleaning fluids, paints, coatings, adhesives, industrial solvents, etc. and hence, they are disseminated both in indoor and outdoor environments, representing a health risk for exposed populations. Exposure to VOCs seems to be important in the epidemiology of human diseases, in fact, positive correlations between VOCs emissions and incidence of some types of cancer (brain, thyroid, skin, pancreatic, etc.) have been found in environmental as well as occupational settings.

A complex situation involving VOCs exposure was recently described in two rivers (Atoyac and Xochiac) of Tlaxcala (Mexico) that flow through inhabited areas where they receive discharges not only from domestic drainage but also from industries. The main VOCs registered in both rivers were chloroform (CLF), dichloromethane (DCM) and toluene (TOL). A biomonitoring study demonstrated that the inhabitants of the areas surrounding the rivers had an increased frequency of genotoxic parameters in their lymphocytes, like micronucleus (MN), suggesting an effect due to environmental exposure to the contaminants present in the rivers.

CLF, DCM and TOL are ubiquitous pollutants found in urban air, workplaces and waste sites. These VOCs are absorbed via the lungs and are then transported by the bloodstream to all organs, leading to toxic effects mainly on liver, kidneys and brain. Toxic effects of CLF, DCM and TOL are mediated by their biotransformation, and the main families of enzymes involved in that process are cytochrome P450s (CYP) and glutathione S-transferases (GST). The metabolites produced during biotransformation are highly reactive electrophiles that are able to form irreversible covalent bonds with biomolecules like DNA, lipids, proteins, etc. Oxidative stress induced by these VOCs has been proposed to be an additional mechanism that can produce secondary biomolecular damage.

Although the mechanism of toxicity of these VOCs is well understood, the results of epidemiological study cannot be explained satisfactorily, this is because all the tests done on animals with individual VOCs are negative for micronucleus test. This led us to consider the possibility that interactions between these VOCs may exist in a mixture and therefore exacerbate its toxic effects.

In order to test this hypothesis, we design an acute exposure study (1 and 3 days), where young rats were exposed to CLF, DCM and TOL separately and in a mixture. After the exposure, xenobiotic metabolism parameters (P450 CYP2E1, GST, GSTT1), oxidative stress (GSH / GSSG, TBARS, antioxidant enzymes), genotoxicity (MNPCE, MHEP) and cytotoxicity (% PCE, mitotic index) were evaluated.

The results obtained in this study show that the behavior of the metabolism, oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity is concerted. On the one hand when the antioxidant defense can contend with the VOCs exposure, there is an induction in xenobiotic metabolism, cell proliferation is normal and there is a tendency for an increased genotoxicity. On the other hand when it exceeds antioxidant defense, xenobiotic metabolism is depressed and more cytotoxic effects than genotoxic events are observed. Another important aspect observed in the study is that the compounds given alone do not show the behavior obtained in mixture, so that the hypothesis of the existence of interactions between these VOCs is reinforced.

The case of Atoyac and Xochiac rivers is just a taste of the reality of the rivers in our country. Ecosystem deterioration is so severe that exceeds all scientific evidence that could bring about this case. It is urgent that those authorities responsible for ensuring the integrity of these areas, assume their ethical and legal obligation to arrest and reverse the impact that industrial and domestic activity has had on the integrity of rivers and welfare of its inhabitants.

## Indice

### 1. Introducción

- Importancia del agua (Pag. 6)*
- Problemática mundial del agua (Pag. 6)*
- Problemática del agua en México (Pag. 7)*
- Calidad de agua y salud (Pag 9)*

### 2. Antecedentes

- Caso de los ríos Atoyac y Xochiac (Pag. 9)*
- Los micronúcleos como biomarcador de daño genotóxico (Pag. 11)*
- Propiedades de los COV encontrados en los ríos Atoyac y Xochiac (Pag. 13)*

### 3. Planteamiento del estudio (Pag. 20)

### 4. Hipótesis (Pag. 20)

### 5. Objetivos generales (Pag. 20)

### 6. Objetivos particulares (Pag.20)

### 7. Diseño experimental

- Modelo animal (Pag. 20)*
- Grupos de exposición (Pag. 20)*
- Vía de administración (Pag. 21)*
- Tiempos de exposición (Pag. 21)*
- Biomarcadores evaluados (Pag. 21)*
- Sacrificio y preparación de muestras (Pag. 22)*

### 8. Resultados

- Estudio de los COV individuales (Pag. 23)*
- Estudio con la mezcla de COV (Pag. 23)*

### 9. Discusión

- Tratamiento de un día (Pag. 26)*
- Tres días de tratamiento (Pag. 27)*
- Estrés oxidante, genotoxicidad y proliferación (Pag. 28)*

### 10. Conclusiones (Pag. 30)

### 11. Referencias (Pag. 31)

### 12. Anexos

- Compuestos orgánicos volátiles (Pag. 40)*
- Metabolismo de xenobióticos (Pag. 45)*
- Técnicas para la determinación de los biomarcadores propuestos (Pag. 51)*
- Artículo publicado (Pag. 55)*

## Tabla de acrónimos y abreviaturas

---

<b>COV</b>	Compuestos orgánicos volátiles
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P450 2E1
<b>GSTT1</b>	Glutación-S-transferasa T1
<b>MNPCE</b>	Micronúcleos en eritrocitos policromáticos
<b>MNHEP</b>	Micronúcleos en hepatocitos
<b>CLF</b>	Cloroformo
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>TOL</b>	Tolueno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>GSH / GSSG</b>	Glutación reducido / Glutación oxidado
<b>P450</b>	Citocromo P450
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>DEN</b>	Dietilnitrosamina
<b>tSO</b>	<i>trans</i> -stilbenóxido
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>Gred</b>	Glutación reductasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>EPA</b>	Agencia de protección ambiental (siglas en inglés)
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (siglas en inglés)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

---

## 1. Introducción.

### Importancia del agua

La importancia del agua puede analizarse desde diferentes puntos de vista, si lo analizamos desde su abundancia, podemos decir que tres cuartas partes de la superficie de nuestro planeta está cubierto por agua [1], además es la sustancia más abundante en los seres vivos, representando aproximadamente el 70% del peso de la mayoría de los organismos [2].

Desde el punto de vista de la Ecología, podemos mencionar que la vida surgió en un medio acuoso y que el curso de la evolución ha sido moldeado por las propiedades químicas del agua [3], además la biodiversidad de nuestro planeta es sustentada en gran medida por este recurso natural. Si se analiza desde el punto de vista bioquímico, el agua juega un papel central en la maquinaria de la vida, es el medio donde se llevan a cabo las reacciones químicas de los seres vivos, determina el giro de la doble hélice del ADN y también determina el plegamiento de las proteínas y por tanto su actividad biológica, etc.[4]

Analizado desde cualquier disciplina, el agua es el medio sobre el cual se sustenta toda nuestra realidad y por tanto su uso racional y su conservación son temas fundamentales para la preservación de todas las especies que habitan el planeta, incluyendo al hombre.

### Problemática mundial del agua

Como se mencionó anteriormente, el agua cubre tres cuartas partes de la superficie terrestre, sin embargo para las actividades humanas, el “agua dulce” es la más importante. Se estima que el agua dulce disponible en el planeta representa el 2.5% del agua total, y tan solo el 0.3% se encuentra en ríos y lagos que es el utilizado por el hombre, el restante 2.2% se encuentra en glaciares y aguas subterráneas [1]. El agua dulce disponible en el planeta es suficiente para sostener a todos sus habitantes y a las especies que dependen de ella, sin embargo la mala administración de este recurso y la grave contaminación que aqueja a ríos y lagos ponen en riesgo la sustentabilidad de la vida en estos cuerpos de agua, así como a las estructuras sociales que el hombre ha creado [5].

Existen diversos ejemplos alrededor del mundo donde se pone de manifiesto que las políticas globales han fallado en proteger a este recurso natural, a continuación se mencionan brevemente algunos de ellos:

- China: Cerca del 90% de los acuíferos en las ciudades de este país está contaminada, haciendo que cerca de 700 millones de habitantes ingieran agua contaminada con desechos humanos y/o animales [6].
- India: Alrededor del 30 % del agua residual es tratada antes de ser desechada, el resto termina en ríos, lagos y aguas subterráneas que proveen de agua de bebida a más de 60 millones de personas. Otro problema es que la defecación a cielo abierto sigue siendo aceptado socialmente, incluso 100 millones de habitantes de la India no poseen inodoro. La Organización Mundial de la Salud estima que 700, 000 personas mueren a causa de diarrea en India [6].
- Rusia: A pesar de que Rusia posee el lago más largo y profundo del planeta, el cuál alberga el 20% del agua dulce superficial del planeta, este país enfrenta también una crisis por el vital líquido. En las poblaciones más densamente pobladas de este país entre el 35 y el 60% del agua potable no tiene la calidad suficiente, esto como resultado de la elevada industrialización [6].
- Estados Unidos: Este país enfrenta un grave problema de sobre explotación de sus recursos, de hecho los lagos Mead y Powell (las mayores reservas de agua en este país) se encuentran a la mitad de capacidad y se estima que queden secos en 20 años [6].

El desafío que actualmente enfrenta la humanidad en el tema de gestión y protección del agua podría agravarse en el largo plazo si no se toman las medidas necesarias. Las proyecciones hacia el 2050 estiman que la población mundial pase de 7 mil millones de personas a más de 9 mil millones y se proyecta que la economía mundial crezca casi cuatro veces, con una creciente demanda de energía y de recursos naturales [7].

## Problemática del agua en México

En México existe una grave problemática de abastecimiento y calidad del agua, se estima que 105 de los 605 acuíferos del país son sobre-explotados [8] y esto aunado con el continuo crecimiento poblacional y las demandas del desarrollo industrial, han provocado una disminución importante de la cantidad de agua disponible *per cápita*, pasando 10,000m<sup>3</sup>/persona /año en 1970, a 4028 m<sup>3</sup>/persona /año en 2012 [9]. La disponibilidad de agua *per cápita* que actualmente existe en el país es considerado como un valor bajo y en años de escasa precipitación se considera peligroso. Es importante resaltar que la disponibilidad de agua que existe en el país puede variar dependiendo del número de pobladores en la región, de la cantidad de agua de lluvia y de la temperatura ambiental. En la tabla 1.1 se resumen los datos para la disponibilidad de agua *per cápita* que en 2005 tenían las distintas Regiones Hidrológicas Administrativas (RHA) del país.

**Tabla 1.1. Disponibilidad de agua por Región Hidrológica Administrativa**

	<b>RHA</b>	<b>Disponibilidad</b>	<b>Categoría</b>
I	Península de Baja California	1282	Muy baja
II	Noroeste	3099	Baja
III	Pacífico Norte	5858	Media
IV	Balsas	2666	Baja
V	Pacífico Sur	7740	Media
VI	Río Bravo	1333	Muy baja
VII	Cuencas Centrales del Norte	1710	Muy baja
VIII	Lerma-Santiago-Pacífico	1791	Muy baja
IX	Golfo del Norte	4632	Baja
X	Golfo Centro	10464	Alta
XI	Frontera sur	24199	Muy Alta
XII	Península de Yucatán	7885	Media
XIII	Aguas del Valle de México y Sistema Cutzamala	186	Extremadamente Baja
	Nacional	4094	Baja

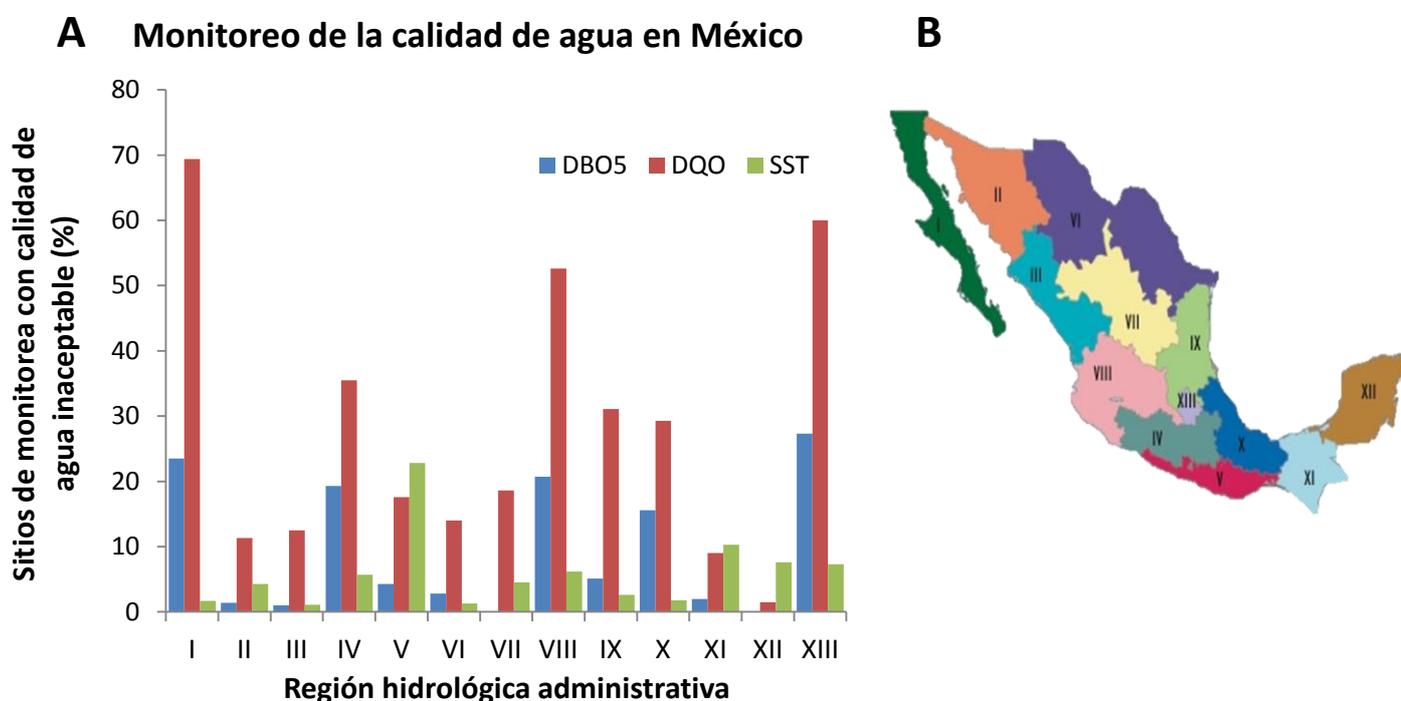
Los valores de la tabla fueron tomados de [8]

Además de la disponibilidad, otro grave problema que enfrenta el país es la contaminación que sufren los cuerpos de agua, en el país existen alrededor de 5150 sitios para el monitoreo de la calidad, los cuales se encuentran distribuidos en las trece RHA [9]. Los sitios de la red para el monitoreo, incluyen seis redes específicas: cuerpos superficiales, aguas subterráneas, estudios especiales, zonas costeras, descargas superficiales y descargas subterráneas.

La calidad de agua se clasifica como excelente, buena, aceptable, contaminada y muy contaminada en base a tres indicadores: la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO<sub>5</sub>), la demanda química de oxígeno (DQO) y los sólidos suspendidos totales (SST) [9].

Los tres indicadores utilizados para medir la calidad del agua son muy generales y por tanto no son específicos, lo que limita la caracterización de la contaminación de los cuerpos de agua. A continuación se definen brevemente los tres parámetros de calidad de agua: la  $DBQ_5$  es una medida semicuantitativa de la cantidad de materia orgánica fácilmente biodegradable que contiene una muestra de agua [10]; la DQO representa la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible de ser oxidada por un agente oxidante fuerte (Ej.  $K_2Cr_2O_7$ ) [11]; finalmente, los SST son sólidos sedimentables, constituidos por materia orgánica en suspensión y/o coloidal, que son retenidas en un elemento filtrante [12].

El último informe de calidad de agua superficial mostró que en promedio el 12% de los puntos de monitoreo se consideran contaminados o fuertemente contaminados para el parámetro de  $DBO_5$  este promedio abarca un rango desde 0% (RHA VII y XII) hasta 23% (RHA I) [9]. En lo que respecta al parámetro de DQO, el 32% de los sitios de monitoreo están contaminados, teniendo un rango de 1.5% (RHA XII) hasta 70% (RHA I). Por último, considerando el parámetro de SST, tenemos una calidad de agua inaceptable en un promedio del 7% de los sitios evaluados, los rangos van desde 1% (RHA III) hasta 23% (RHA V) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** A) Se muestran los porcentajes de calidad de agua inaceptable registrados en el último monitoreo (2012) de las aguas superficiales en el país (B) Ubicación geográfica de las 13 RHA en el país. La figura fue creada tomando los valores de [9]

Con el objetivo de preservar la calidad del agua, se construyen plantas de tratamiento de aguas residuales para su posterior descarga a los ríos y cuerpos de agua. Al 2012, se encontraban en operación 2342 plantas en el país, que son capaces de tratar  $99.8m^3/seg$  de descargas municipales, lo que representa el 47.5% del flujo total de aguas de desecho [8], [9]. Sin embargo, este número de plantas es insuficiente, ya que se estima que entre descargas municipales e industriales se generan alrededor de 12 millones de toneladas de materia orgánica al año (medida como  $DBO_5$ ) y las plantas de tratamiento tan sólo remueven el 17% de los desechos. Otro aspecto a destacar de las descargas en los cuerpos de agua además es que las descargas municipales son recolectadas en sistemas de alcantarillado, donde son dirigidas a plantas de tratamiento, mientras que las descargas industriales son descargadas directamente a los cuerpos receptores de propiedad nacional [8], [9].

El deterioro de los cuerpos de agua en México es evidente y existen numerosos ejemplos ello: el Río Papaloapan (Veracruz) recibe la descarga de dos ingenios azucareros, además de desechos municipales, provocando la muerte de miles de peces y afectando gravemente el ecosistema [13][14]; el Río Santiago (Guadalajara) recibe descargas de 159 industrias, en muestras de los sedimentos se han encontrado residuos tóxicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, benzaldehídos, xilenos, furanos, metales pesados, etc [15].; el último caso de gran impacto que se tiene registrado en el país es el que ocurrió el pasado 7 de agosto del 2014, cuando la minera de Grupo México derramó accidentalmente 400mil m<sup>3</sup> de sulfato de cobre acidulado, lo que contaminó aproximadamente 190km del Río Sonora con una gran cantidad de metales pesados [16]. Estos son sólo algunos ejemplos de la realidad que viven los cuerpos de agua en nuestro país, donde es evidente que las políticas públicas han fallado en proteger los recursos naturales de México.

## Calidad de agua y salud

Además del impacto sobre los ecosistemas, la contaminación del agua afecta la salud de las personas que usan esta agua o que simplemente viven cerca de algún cuerpo de agua contaminado. Existen diversos tipos de contaminación del agua, estos contaminantes pueden clasificarse en macro-contaminantes, micro-contaminantes y patógenos [17]. De los tipos de contaminación, el que tiene el mayor impacto en la salud humana es la presencia de patógenos en el agua de bebida, se estima que la carencia de agua segura y la falta de saneamiento cobra la vida de 1.6 millones de personas en el mundo cada año, de los cuales el 90% son niños menores de 5 años [18]. Dentro de los principales patógenos que contaminan el agua de bebida se encuentra *Salmonella typhimurium*, *S. paratyphi*, *Giardia lamblia*, *virus de la hepatitis A y E*, *Cryptosporidium parvum*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, etc[17].

Los macro-contaminantes se encuentran en concentraciones elevadas en el agua (mg/L) e incluyen nutrientes como especies de nitrógeno y fósforo, así como constituyentes orgánicos naturales. La elevada concentración de estos nutrientes puede llevar a un incremento en la producción de biomasa y consumir el oxígeno disuelto (lo que destruye el equilibrio ecosistémico), además de favorecer la proliferación de algas tóxicas que producen sustancias muy peligrosas para el ser humano [19].

Finalmente, los micro-contaminantes que se encuentran en concentraciones a nivel de trazas (ng/L), estos compuestos están constituidos por sustancias inorgánicas (metales pesados, metaloides) y moléculas orgánicas de muy diversas estructuras. Los contaminantes inorgánicos pueden tener diferentes efectos en la salud de las personas, por ejemplo, el mercurio (Hg) y el plomo (Pb) son neurotóxicos, mientras que el cadmio (Cd) y el arsénico (As) son cancerígenos [20]. En lo que respecta a los contaminantes orgánicos se pueden presentar pesticidas que son bioacumulables (Ej. DDT), algunos fármacos que son disruptores hormonales y que pueden alterar el equilibrio ecológico, también se pueden encontrar compuestos volátiles que pueden entrar en fase gaseosa y ejercer su acción tóxica a grandes distancias del punto de descarga [21], por ejemplo el benceno que es un compuesto comúnmente encontrado en ríos que reciben desechos industriales y que es un cancerígeno.

## 2. Antecedentes

### Caso de los ríos Atoyac y Xochiac

La contaminación de los ríos Atoyac y Xochiac, es un caso complejo de exposición a COV, donde se ven comprometidos tanto la integridad ecológica como la salud humana. Estos ríos se ubican en la subregión de la Cuenca del Alto Atoyac perteneciente a la región hidrológica del Balsas; a su vez, estos ríos atraviesan los estados de Puebla y Tlaxcala en la subregión del alto Balsas (Fig. 2.2 A). Dicha región se caracteriza por ser una zona de transición rural-urbana, en la cual se llevan a cabo tanto actividades industriales (petroquímica, empresas textiles, fábricas de químicos aromáticos para la industria alimenticia, actividades metalúrgicas) como agrícolas que requieren gran cantidad de agua [22].

El interés por estudiar la contaminación en estos ríos se originó por la denuncia del surgimiento de enfermedades en las comunidades cercanas a las descargas industriales. Las enfermedades presentes en las comunidades que motivaron la denuncia son **leucemia, púrpura trombocitopénica y anemia**. El registro de los casos de leucemia mostró que la incidencia de esta enfermedad está muy por arriba de la incidencia nacional y mundial, en México la incidencia de leucemia es de 2.7 casos /100mil habitantes, en el resto del mundo la incidencia es de 10 casos (5 hombres/5mujeres) /100mil habitantes en un rango de edad de 0-44 años [23]. En el caso de las localidades de estudio el rango de incidencia es de 1812-50 casos / 100mil habitantes (Tabla 1.2)

**Tabla 2.1.** Incidencia de Leucemia en las comunidades cercanas al Río Atoyac

Comunidad (Clave)	Número de habitantes (2010)*	Casos de Leucemia**	Incidencia de leucemia (casos/100mil habitantes)
San Baltazar (0058)	331	6	1812,7
Tepetitla (019)	8316	5	60,1
Villa Alta (0009)	5974	3	50,2
San Mateo Ayecac (0007)	3366	2	59,4

\*Datos tomados de SEDESOL referencia [24]

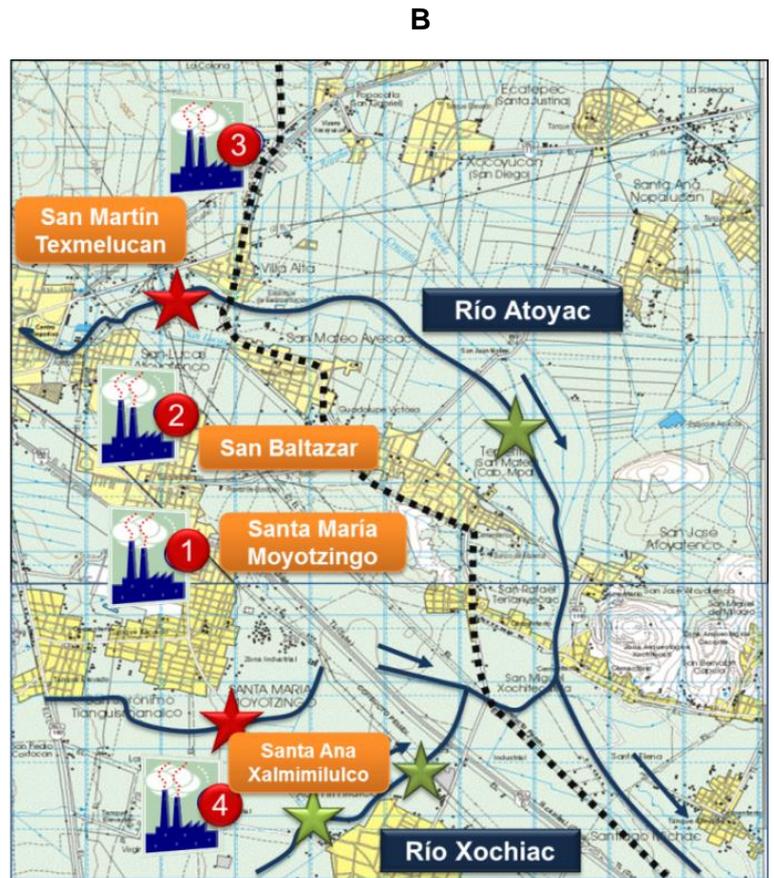
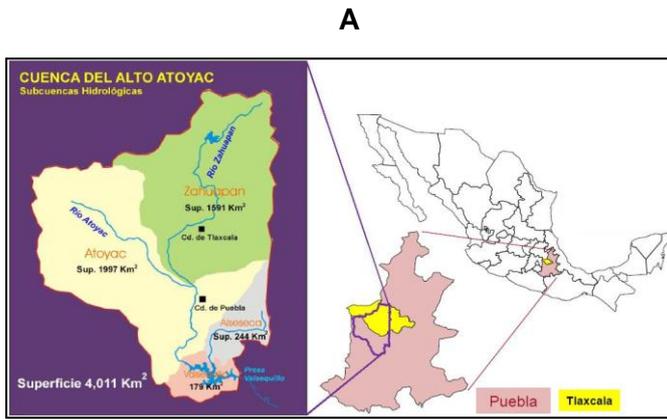
\*\*Registro de casos tomado de referencia [25]

Es importante mencionar que el registro histórico de los casos de leucemia se realizaron desde la década de los 90's y hasta el año 2003, por lo que los datos de incidencia que aquí se presentan deben ser tomados sólo como una aproximación, ya que la incidencia de la enfermedad tiene variaciones dependiendo del crecimiento demográfico. Por lo tanto es crucial la caracterización año con año de la aparición de nuevos casos y la prevalencia de la enfermedad en las diferentes comunidades con la finalidad de tener comparaciones más precisas.

Con el objetivo de caracterizar la zona de contaminación, se evaluó la calidad de agua de los ríos, los contaminantes presentes en ellos y se llevó a cabo un biomonitoreo en los pobladores para estudiar si realmente existía una afectación en la salud de los pobladores producida por la contaminación de los ríos [25]. Las principales fuentes de contaminación (Fig.2.2 B) en la Cuenca Alta del Atoyac proceden de las descargas de origen doméstico y público que constituyen las aguas residuales de origen municipal, residuos sólidos (basura) y las descargas de aguas residuales de origen industrial (de los corredores industriales Quetzalcóatl, Huejotzingo e Ixtacuixtla) (Dictamen de la Cámara de Diputados, expediente 792) [26].

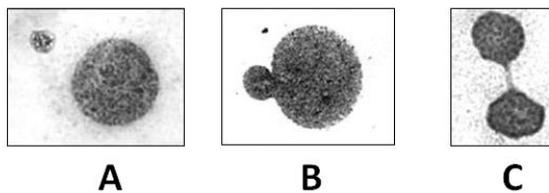
Mediante una caracterización ambiental se constató la existencia de problemas de contaminación en la Cuenca del Alto Río Atoyac [22][25][27]. Entre los contaminantes que se identificaron en el río se encuentran: grasas y aceites por encima de los límites permitidos; sólidos suspendidos y sedimentados y una demanda bioquímica de oxígeno que supera los límites máximos; compuestos como fluoruros, diclorometano (DCM), tolueno (Tol) y cloroformo (CLF) en concentraciones elevadas; también materia orgánica. Todo lo cual disminuye el oxígeno necesario para sustentar la vida acuática normal (Dictamen de la Cámara de Diputados, expediente 792).

A través de un biomonitoreo realizado en los habitantes de algunas poblaciones cercanas a las zonas de descarga industrial hacia los ríos Atoyac y Xochiac se detectó un incremento significativo en el daño genotóxico (daño al material genético) dos veces mayor que el encontrado en individuos que viven en la ciudad de México [27] (Figura 1.3). Lo anterior reveló una asociación positiva entre la exposición ambiental a los contaminantes presentes en los ríos y el daño genotóxico evaluado (micronúcleos).



**Figura 2.1.** A) Ubicación geográfica de las áreas de los estados de Puebla y Tlaxcala pertenecientes a la subregión de la Cuenca del Alto Atoyac, así como la ubicación aproximada del Río Atoyac. B) Mapa donde se muestra la ubicación de las principales fuentes de contaminación industrial de los ríos Atoyac y Xochiac en la zona de la Cuenca Alta del Atoyac: 1) Complejo Petroquímico Independencia, 2) Corredor Industrial Quetzalcoatl, 3) Corredor Industrial Ixtlacuixtla y 4) Corredor Industrial Huejotzingo. Adicionalmente se indican los nombres de las poblaciones vecinas (títulos en naranja). La línea punteada indica el límite político entre Puebla (lado izquierdo) y Tlaxcala (lado derecho). (Modificado de [27])

Debido a que los residentes de la zona no usan más esta agua de estos ríos para el riego de sus parcelas y ya que no efectúan actividades recreativas como la pesca o la natación en estos ríos, se consideró que la vía de exposición más probable sería la aérea, de tal forma que los candidatos a ser los responsables del daño genotóxico encontrado en los pobladores, eran los COV detectados en los ríos. Los COV que se encontraron recurrentemente a lo largo de los ríos fueron el CLF, DCM y TOL.



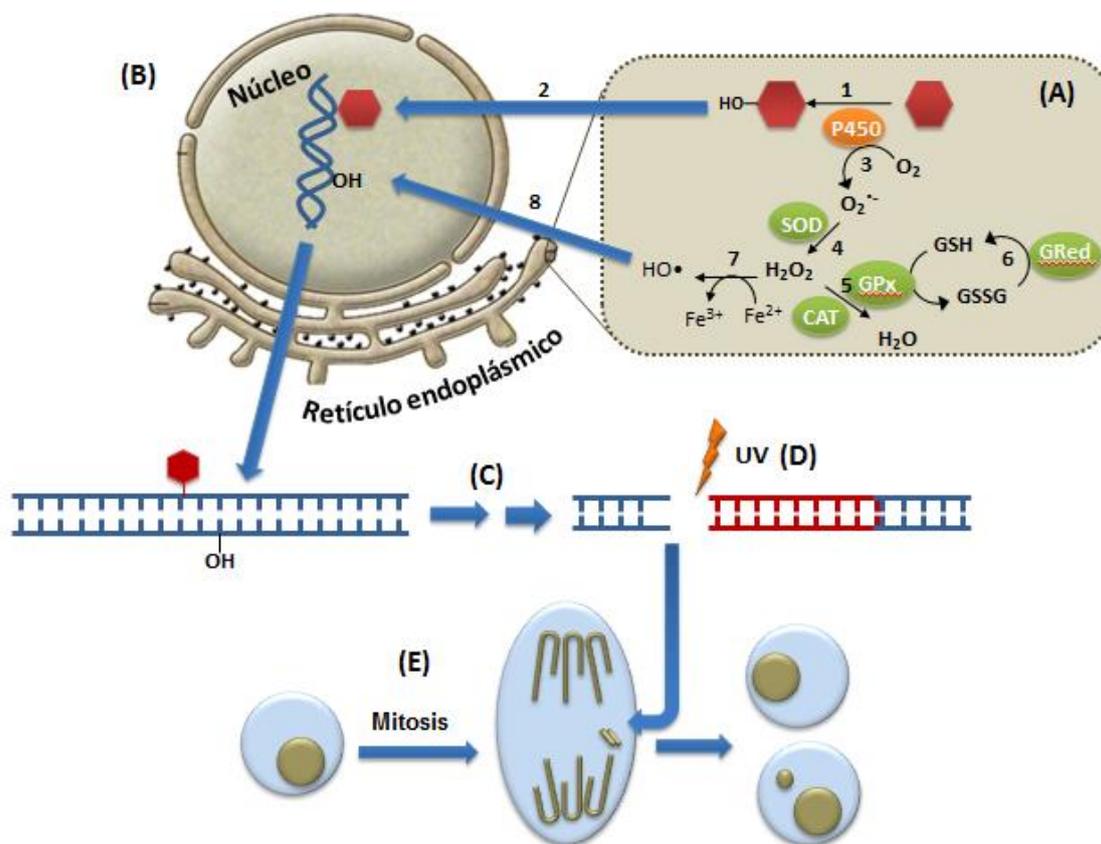
**Figura 2.2.** Imágenes de algunos tipos de daños genotóxicos identificados en la evaluación de linfocitos de los habitantes con viviendas cercanas a los ríos Atoyac y Xochiac. Tomado y modificado de ref [27]. (A) Linfocito con micronúcleo; (B) Linfocito con gemación de cromatina; (C) Linfocitos con puente nucleoplásmico.

## Los micronúcleos como biomarcador de daño genotóxico

Con la finalidad de entender la asociación entre la frecuencia de micronúcleos (MN) y la contaminación de los ríos es esencial profundizar en los mecanismos que dan lugar a la formación de estos corpúsculos celulares. Está bien establecido que los MN principalmente se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos (eventos clastogénicos) o cromosomas completos que no pueden ser incorporados en los núcleos de células hijas durante la mitosis (eventos aneugénicos). Estos cromosomas o fragmentos son eventualmente envueltos por una membrana nuclear y por tanto son morfológicamente similares al núcleo principal, con excepción de que el tamaño del MN es menor [28].

### Formación de fragmentos acéntricos

Los fragmentos de cromosomas acéntricos pueden originarse por múltiples vías. Los estudios con radiación han demostrado que los rompimientos de la doble cadena de ADN que no son reparados, pueden llevar a la formación de fragmentos cromosómicos [29]. Otro mecanismo de formación de MN incluye la reparación simultánea por escisión de bases dañadas (ej 8-oxo-desoxiguanosina) o bases inapropiadas incorporadas en el ADN (Ej. uracilo)[30]. Estos eventos de reparación simultánea por escisión de bases, lleva a rompimientos de doble cadena en el ADN y por tanto a la formación de MN [31]. Este proceso de formación de MN se induce cuando las células se exponen a compuestos que forman aductos con el ADN[28].

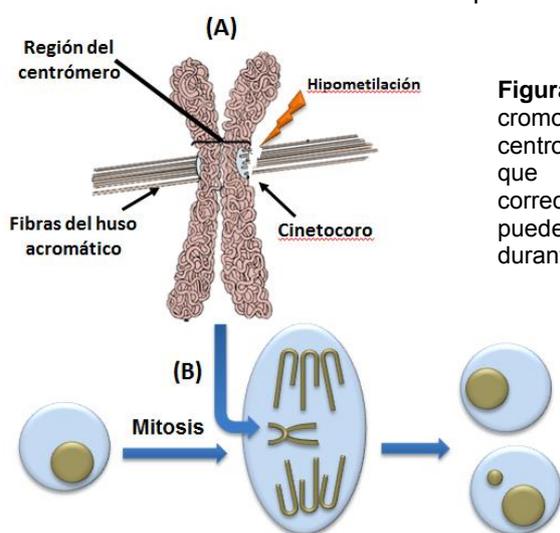


**Figura 2.3.** Mecanismo de formación de micronúcleos a partir de fragmentos acéntricos. **(A)** Cuando un compuesto ajeno al organismo (xenobiótico) entra a la célula, puede ser metabolizado por diversos sistemas enzimáticos, dentro de los cuales el más importante es el citocromo P450 (P450). Este sistema enzimático se encarga de oxidar a los xenobióticos en una reacción dependiente de NADPH (1), esta oxidación forma un centro nucleofílico el cuál es muy reactivo y en algunas ocasiones puede formar enlaces covalentes (aductos) con diversas biomoléculas, incluido el ADN (2). Otro mecanismo que puede dañar al ADN es la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) es considerado como la ERO primaria, esto debido a que da origen al resto de las ERO, dicho radical es formado en diversos sistemas enzimáticos donde hay transferencia de electrones (3). El radical superóxido es convertido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la superóxido dismutasa (SOD) (4) y finalmente del  $H_2O_2$  es desintoxicado por diversas enzimas (5) tales como la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx). Es importante destacar que glutatión (GSH) es un agente reductor muy importante en la desintoxicación de ERO y que su ciclo redox depende de la glutatión reductasa (GRed) (6). Cuando la formación de  $H_2O_2$  rebasa la capacidad antioxidante y no es desintoxicada, entonces puede reducirse para formar al radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) el cuál es una ERO muy dañina para la célula y puede formar aductos con el ADN (8). Los aductos formados por los xenobióticos nucleofílicos o por las ERO pueden producir rompimientos de doble cadena al intervenir el sistema de reparación por escisión de bases **(C)**. Otro mecanismo de producción de rompimientos de la doble cadena es por radiación ionizante **(D)**. Finalmente la producción de rompimientos en el ADN puede dar lugar a la formación de MN durante la división celular **(E)**.

### Formación de MN por cromosomas mal segregados

Los MN presentes en linfocitos de personas sanas que no están expuestas a genotoxinas, usualmente tienen su origen en eventos de pérdida de cromosomas completos. Existe un incremento en los MN relacionado con la edad y es generalmente mayor en mujeres que en hombres. Los cromosomas sexuales contribuyen a la mayoría de los eventos de pérdida de cromosomas, en mujeres, el cromosoma X representa el 72% de los MN observados y se ha sugerido que esto se debe a la inactivación de dicho cromosoma [32].

Un posible mecanismo que explica la formación de micronúcleos por una mala segregación cromosómica es la hipometilación de la citosina en las secuencias centroméricas y pericentroméricas [28]. El ensamblaje de las proteínas del cinetocoro a los centrómeros se ve afectado por el estatus de la citosina, así como en la metilación de las histonas [33]. Dado el papel central de las proteínas del cinetocoro en el ensamblaje de los cromosomas al huso acromático, es posible que las mutaciones que afecten al cinetocoro o a las interacciones con los microtúbulos puedan causar la formación de MN por la pérdida de



**Figura 2.4.** Formación de micronúcleos por pérdida de cromosomas completos. **(A)** La hipometilación del ADN centromérico o de las histonas del cinetocoro, puede provocar que las fibras del huso acromático no se ensamblen correctamente. **(B)** El mal ensamblaje del huso acromático puede provocar una segregación incorrecta de los cromosomas durante la mitosis y dar origen a un micronúcleo.

### Propiedades de los COV hallados en los ríos Atoyac y Xochiac

- **Cloroformo**

Propiedades fisicoquímicas

El CLF es un compuesto trihalogenado, no polar ( $\log Kow \approx 2$ ), volátil y estable ( $t_{1/2}$  en aire = 80 días). A temperatura ambiente el CLF es un líquido denso (1.48g/mL), incoloro, no flamable, poco soluble en el agua y miscible en solventes orgánicos [34].

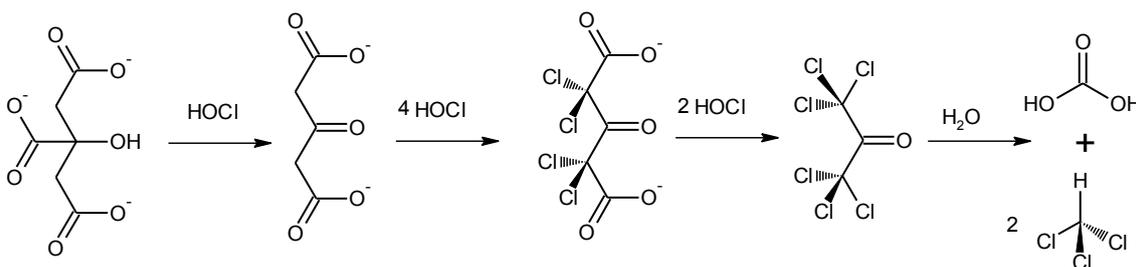
**Tabla 2.2.** Recopilación de algunas características fisicoquímicas del cloroformo [34], [35].

Fórmula química	Peso Molecular	Fuentes de exposición	Clase Química	Clase de volatilidad	P. de vapor (mm Hg <sup>25°C</sup> )	Punto de ebullición	Solubilidad en agua (g/L a 25°C)
<chem>CHCl3</chem> 	119.4	Cloración de agua; Industria química	Hidrocarburos halogenados	COV	197	62	8

### Fuentes de exposición

El cloroformo tiene múltiples usos industriales, por ejemplo como intermediario en reacciones químicas, como solvente o como extractor de sustancias no polares, por lo tanto existen personas expuestas laboralmente durante la síntesis y manipulación del CLF. Sin embargo, la fuente de exposición más común al CLF es el agua, esto se debe a que durante la cloración del agua se forman diversos compuestos halogenados, siendo el cloroformo el compuesto más abundante [36].

El CLF se forma por la reacción del hipoclorito con la materia orgánica, por ejemplo, se ha descrito que el ácido cítrico, presente materia orgánica (frutas, hojas, fluidos humanos) y productos industriales (shampoos, detergentes, aditivos, etc.), pueden ser precursores importantes para la formación de CLF [37].



**Figura 2.5. Mecanismo de formación del cloroformo a partir del ácido cítrico y el ácido hipocloroso** [37]. Se ha descrito que el cloroformo puede formarse a partir de la reacción entre la materia orgánica y el hipoclorito durante el tratamiento del agua. En esta figura se muestran algunos intermediarios en la formación del cloroformo a partir del ácido cítrico y el ácido hipocloroso.

La formación de CLF depende de varios factores como la temperatura, el pH, la presencia de metales y la concentración de cloro. En general a mayor temperatura, mayor pH, mayores concentraciones de cloro [38] y en presencia de cobre [37], la formación de cloroformo puede ser más eficiente.

### Efectos tóxicos

La IARC y la EPA clasifican al cloroformo como posible carcinógeno humano (Grupo 2B) [39] ya que existen evidencias suficientes de cáncer de hígado y riñón para roedores [40]. Los principales efectos tóxicos que causa el cloroformo se muestran en la tabla 2.2.

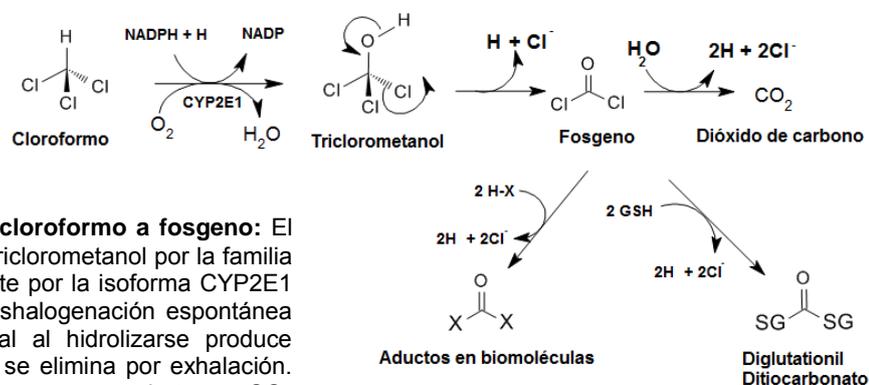
**Tabla 2.3.** Clasificación de algunos efectos que causa la exposición a cloroformo [40][41].

Tipo de efecto	Daños
Cancerígeno	- Produce cáncer de colon y vejiga. - Produce quistes en hígado y carcinoma hepático
Otros	- En humanos se ve afectado el sistema nervioso central (SNC), el hígado y los riñones. Además causa fatiga, mareos, dolor de cabeza y arresto respiratorio. - Produce bajo peso del producto al nacer, así como muerte o malformaciones congénitas. Hepatitis tóxica en hijos de mujeres expuestas.

Toxicocinética: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción.

El CLF se encuentra presente en el ambiente como resultado de la actividad industrial y la cloración del agua, por lo tanto el cloroformo se encuentra principalmente en agua potable, piscinas, descargas municipales e industriales. Una vez ocurrida la exposición, el CLF llega a torrente sanguíneo (proceso de absorción), mediante la vía oral (ingestión), inhalatoria (ducha) o dérmica (natación), distribuyéndose en todo el organismo, principalmente en tejido adiposo, hígado y riñón [42], estos dos últimos órganos son considerados como órganos blanco[43].

El CLF puede ser metabolizado en otros compuestos químicos (metabolitos), a través de reacciones mediadas por enzimas en los diferentes órganos. El hígado es el principal órgano donde se lleva a cabo el metabolismo del CLF por enzimas de P450, principalmente la isoforma CYP2E1 (Fig.2.5). El fosgeno es un metabolito del CLF que posee una alta reactividad y puede causar efectos tóxicos al unirse covalentemente a biomoléculas como proteínas, lípidos, glutatión, etc. Algunos otros metabolitos del cloroformo pueden ser excretados del cuerpo mediante la exhalación, y sólo una menor parte mediante la orina y heces [44].



**Figura 2.6. Metabolismo del cloroformo a fosgeno:** El cloroformo es transformado en triclorometanol por la familia de enzimas CYP, principalmente por la isoforma CYP2E1 y posteriormente sufre una deshalogenación espontánea para producir fosgeno, el cual al hidrolizarse produce dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que se elimina por exhalación. La proporción de fosgeno que no se convierte en CO<sub>2</sub> puede unirse a proteínas y lípidos. Sin embargo tras tener una deshalogenación reductora puede formar conjugados con el glutatión (GSH), generando así intermediarios mutagénicos como el diglutatiónil ditiocarbonato.

• **Diclorometano**

Propiedades fisicoquímicas

El diclorometano es un compuesto orgánico cuya presencia en el ambiente se atribuye principalmente a la actividad industrial. Entre sus características fisicoquímicas (tabla 2.3), la que determina su rango de uso es su propiedad como solvente [45].

**Tabla 2.4.** Descripción de algunas características fisicoquímicas del diclorometano [35][46].

Fórmula química	Peso Molecular	Fuentes	Clase química	Clase de volatilidad	Presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Punto de ebullición	Solubilidad en agua (g/L a 25°C)
 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84.9	Industria química: solvente	Hidrocarburo halogenado	VVOC	435	40	13.2

Efectos tóxicos

El diclorometano es una sustancia tóxica clasificada por la IARC como posible carcinógeno humano [39] debido a que se cuenta con evidencias suficientes para roedores [47]. Los principales efectos tóxicos que causa el diclorometano se muestran en la tabla 2.4

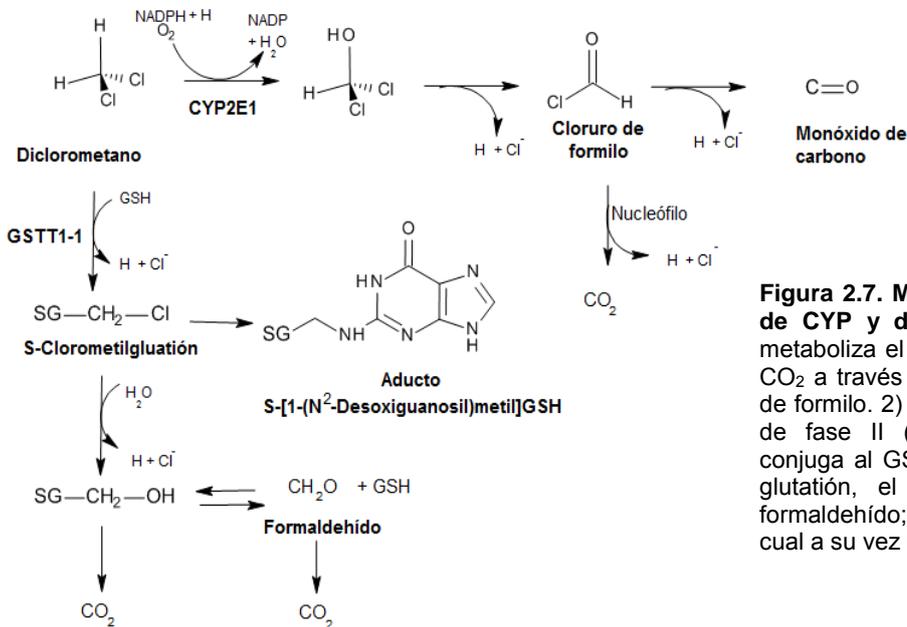
**Tabla 2.5.** Clasificación de algunos efectos que causa la exposición a diclorometano [47][48].

Tipo de efecto	
<b>Cancerígeno</b>	Produce carcinoma hepático.
<b>Otros</b>	Afecta el SNC, la actividad motora, la estructura hepática (infiltración grasa); disminuye la respiración. En humanos causa mareos, náusea, entumecimiento y adormecimiento de los dedos de pies y manos, entorpecimiento, embriaguez, pérdida de la consciencia, irritación y quemaduras de los ojos y daño a la córnea (Wilson, 2000). También produce aumento de la enfermedad coronaria e infartos al miocardio, así como un aumento de carboxihemoglobina.  Produce anomalías de los espermatozoides y disminución en la calidad del semen. Provoca pequeños efectos en peso materno y del feto.

Toxicocinética: Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción

La vía de exposición más común para el diclorometano es la inhalatoria, aunque también puede ser dérmica o por ingestión. En general, la absorción sucede de manera rápida y la distribución se dirige mayoritariamente al hígado, tejido graso, riñón, cerebro y pulmones; sin embargo, no se presenta una acumulación significativa en los tejidos [46].

En cuanto al metabolismo de éste VOC es relevante mencionar que puede ser biotransformado mediante las enzimas CYP (en particular CYP2E1) o mediante la enzima Glutatión-S-Transferasa Theta 1 (GSTT 1-1) (Fig.2.6). Ambas vías metabólicas producen metabolitos tóxicos (Ej. dióxido de carbono, monóxido de carbono y formaldehído) [49]. La preferencia por la vía metabólica depende de las concentraciones a las que el organismo se encuentre expuesto. La vía de CYP ocurre con mayor frecuencia a bajas concentraciones (<500ppm ≈ 2mmol/kg), pero al aumentar la concentración (>500ppm), ésta vía se satura y se activa la vía de GSTT 1-1[50]. Al final, tanto el diclorometano como sus metabolitos son excretados del cuerpo mayoritariamente mediante la exhalación y en una menor proporción mediante la orina y heces.



**Figura 2.7. Metabolismo del DCM mediante la vía de CYP y de GSTT1-1:** 1) La isoforma CYP2E1 metaboliza el DCM en monóxido de carbono (CO) y  $\text{CO}_2$  a través de un intermediario reactivo: el cloruro de formilo. 2) La GSTT 1-1 interviene el metabolismo de fase II (reacciones de conjugación) ya que conjuga al GSH con DCM para formar S-clorometilglutatión, el cual al ser deshalogenado origina formaldehído; a partir de éste se produce  $\text{CO}_2$ , el cual a su vez será excretado del cuerpo.

- **Tolueno**

Propiedades fisicoquímicas

El tolueno es una sustancia incolora y con un olor distintivo, la cual es producida en el proceso de obtención de gasolinas y otros combustibles [51]. A continuación se muestra la tabla 2.5 con algunas características fisicoquímicas de este VOC.

**Tabla 2.6.** Descripción de algunas características fisicoquímicas del tolueno [35] [52].

Fórmula química	Peso Molecular	Fuentes	Clase química	Clase de volatilidad	Presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Punto de ebullición	Solubilidad en agua (g/L a 25°C)
$C_7H_8$ 	92.1	-Petróleo -solventes -gasolina	Hidrocarburos aromáticos	COV	28.6	111	0.53

Efectos tóxicos

La IARC considera al tolueno en el grupo 3 como no clasificable carcinógeno para el hombre [39]. La EPA determinó que el tolueno no es clasificable por su carcinogenicidad [52]. Los principales efectos tóxicos que causa el tolueno se describen en la tabla 2.6.

Toxicocinética: Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción

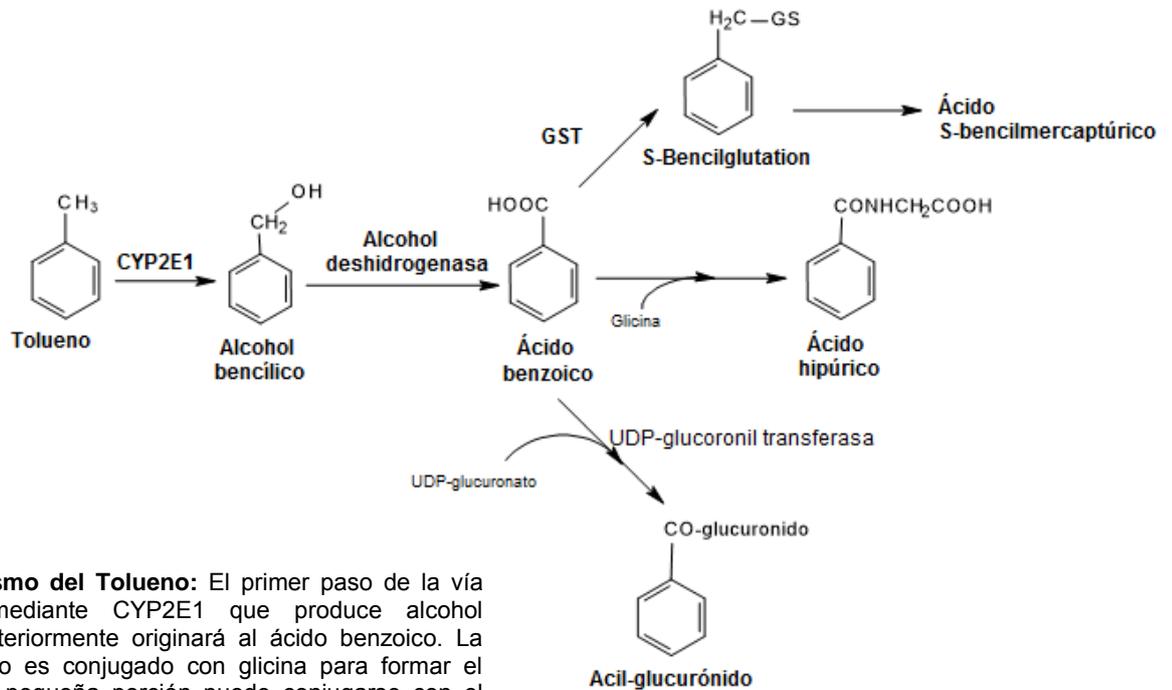
La manera más común en que el tolueno puede ingresar al organismo es después de haber una exposición por inhalación, contacto dérmico e ingestión de comida o agua contaminada. Cuando éste VOC es absorbido, se concentra principalmente en tejido adiposo, cerebro, pulmón y médula ósea; también se distribuye en hígado y riñón en menor concentración. La bioacumulación se presenta en el tejido adiposo y médula ósea [52].

Generalmente, el organismo metaboliza al tolueno en compuestos químicos menos dañinos (Ej. ácido hipúrico) mediante enzimas de fase I (CYP) y fase II (Ej. Glutación S transferasas o GSTs) (fig.2.6). El ácido hipúrico es el metabolito mayoritario del Tol, mientras que los metabolitos minoritarios según su orden decreciente de abundancia son: el conjugado glucoronil del ácido benzoico, los conjugados de sulfatos y glucurónidos del cresol, el ácido S-bencilmercaptúrico, y el ácido S-p-toluilmercaptúrico [53]. Un 75% del tolueno absorbido y sus metabolitos son excretados dentro de las siguientes 12 horas mediante exhalación u orina [52].

**Tabla 2.7.** Clasificación de algunos efectos que causa la exposición a tolueno [51][52].

Tipo de efecto	
Cancerígeno	No hay efectos cancerígenos

Sistémico	El principal efecto es daño al cerebro. Ocasiona dolor de cabeza, mareos, somnolencia, incapacidad de concentración, confusión, debilidad, náusea, problemas para hablar, oír y ver; pérdida de memoria y del apetito; falta de control motriz. Causa irritación en las mucosas de nariz y garganta, así como en las conjuntivas oculares; provoca albuminuria y daño renal. Incremento de riesgo en abortos espontáneos; disminución de la hormona luteinizante, foliculo estimulante y testosterona en machos.
-----------	--



**Figura 2.8. Metabolismo del Tolueno:** El primer paso de la vía metabólica ocurre mediante CYP2E1 que produce alcohol bencílico, el cual posteriormente originará al ácido benzoico. La mayoría de éste ácido es conjugado con glicina para formar el ácido hipúrico, y una pequeña porción puede conjugarse con el UDP-glucuronato para formar el acil-glucurónido. Entre el 1-5% del Tol absorbido es metabolizado en cresol por la isoforma CYP1A2, el cual es conjugado con sulfatos o glucuronatos para ser eliminados vía orina.

### Estudios de genotoxicidad

En la tabla 2.7 se presentan algunos efectos genotóxicos reportados para el cloroformo, diclorometano y tolueno. De acuerdo con los datos de genotoxicidad conocidos para estos VOCs, se determina que:

- El cloroformo es un mutágeno débil con un bajo potencial de interacción con el ADN, pues la mayoría de los ensayos de genotoxicidad tienen resultados negativos. Los resultados positivos de genotoxicidad se deben a la producción de metabolitos reactivos y a la alteración de la proliferación celular.
- El diclorometano se considera como un mutágeno débil en mamíferos, pues hay resultados contrapuestos. Su genotoxicidad depende de la capacidad que tenga cada tejido para metabolizar al DCM; ya que el metabolismo se lleva a cabo por GSTT1-1, los efectos genotóxicos serán diferentes dependiendo del fenotipo de GSTT1-1.
- El tolueno se considera como no mutagénico y no genotóxico según la mayoría de resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*.

**Tabla 2.8.** Efectos genotóxicos en humanos y animales (*in vitro* e *in vivo*) que son causados por los principales VOCs encontrados a lo largo del río Atoyac, Tlaxcala.

VOC	Organismo	Tipo de estudio	Efecto
Cloroformo	Humano	<i>In vivo</i>	Sin datos
		<i>In vitro</i>	Incremento de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos.
	Animal (ratones, Saltamontes, rata)	<i>In vivo</i>	Incremento en frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en células de médula ósea de ratón; arresto mitótico en embriones de saltamontes. Inducción de micronúcleos en riñón e hígado de rata; daño cromosómico en médula ósea de rata.
		<i>In vitro</i>	Mutaciones en células de linfoma ante activación metabólica.
Diclorometano	Humano	<i>In vivo</i>	Sin datos
		<i>In vitro</i>	Formación dosis-dependiente de aductos de formaldehído con ARN en hepatocitos.
	Animal (Hámster chino, ratones, rata)	<i>In vivo</i>	Detección de rompimiento de ADN en hígado y pulmón de ratones; rompimiento de ADN en hígado de rata; intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos periféricos y células pulmonares de ratón; Producción de micronúcleos en eritrocitos periféricos de ratón; aberraciones cromosómicas en células de médula ósea y pulmón en ratón.
		<i>In vitro</i>	Inducción de rompimiento del ADN en células ováricas de hámster y en hepatocitos de ratón; formación de aductos de formaldehído con ARN en hepatocitos de ratón, rata y hámster; aberraciones cromosómicas en hámster chino y en linfoma de ratón (Wilson, 2000).
Tolueno	Humano	<i>In vivo</i>	Incremento en la incidencia de rompimiento de cromátidas hermanas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas en trabajadores expuestos a tolueno y a otros compuestos; aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos (Dorsey, 2000).
		<i>In vitro</i>	Sin resultados positivos
	Animal (saltamontes, rata)	<i>In vivo</i>	Arresto mitótico en saltamontes; aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de rata (Dorsey, 2000). Inducción de micronúcleos en médula ósea en rata (Mohtashamipur, 1985).
		<i>In vitro</i>	Sin resultados positivos

### **3. Planteamiento del estudio**

A pesar de que se conoce mucho sobre la toxicocinética de estos COV, los resultados de genotoxicidad en la literatura son contradictorios y demuestran baja actividad de cada compuesto por separado, de tal forma que nos planteamos la pregunta de si los eventos de genotoxicidad obtenidos en el monitoreo hecho en la zona del Atoyac podrían deberse a la co-exposición a estos compuestos que al interactuar entre sí, podrían exacerbar los efectos tóxicos que se obtienen cuando la exposición es con los compuestos individuales, probablemente induciendo un estrés oxidante que a su vez contribuyera en aumentar la genotoxicidad.

### **4. Hipótesis**

La co-exposición a tolueno, cloroformo y diclorometano inducirá daño genotóxico mediado por la bioactivación y/o el estrés oxidante.

### **5. Objetivos generales**

Evaluar el daño genotóxico, el metabolismo de xenobióticos y el estrés oxidante en ratas expuestas a una mezcla de tolueno, cloroformo y diclorometano.

### **6. Objetivos particulares**

- Aplicar la técnica de micronúcleos en médula ósea (MNPCE) y en hepatocitos (MNHEP) para evaluar los efectos genotóxicos de la mezcla.
- Determinar la concentración de P450, así como la actividad de CYP2E1, GST y GSTT1 como biomarcadores del metabolismo de xenobióticos.
- Medir la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, y GRed), así como algunas moléculas como glutatión reducido/oxidado o TBARS, esto con el objetivo de caracterizar el posible estrés oxidante

### **7. Diseño experimental**

#### **Modelo animal**

Para todos los tratamientos se utilizaron ratas macho Wistar de tres semanas de edad (70-120g), las cuales se aclimataron una semana a condiciones de 20°C ± 2 y ciclos de luz / oscuridad de 12 horas, además tuvieron libre acceso al alimento y agua.

#### **Grupos de exposición**

Se utilizaron cuatro grupos de tratamiento (5 animales/grupo); tres grupos recibieron diferentes dosis de una mezcla de cloroformo (CLF), diclorometano (DCM) y tolueno (TOL), el cuarto grupo fue utilizado como control y recibió aceite de maíz (Tabla 3.1).

Las dosis de la mezcla fueron basadas en la LD50 de cada componente, de tal manera que la dosis más alta corresponde al 10% de la LD50 y el resto de las dosis son diluciones sucesivas con un factor de 2.

**Tabla 7.1.** Grupos de tratamiento para la mezcla

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento (mmol/kg de p.c.)</b>
CT	Aceite (125µL/Kg)
	TOL / DCM / CLM
Dosis Baja (Mez B)	2.0 / 0.62 / 0.65
Dosis Media (Mez M)	4.0 / 1.25 / 1.30
Dosis Alta (Mez A)	8.0 / 2.51 / 2.61

Adicionalmente cuatro grupos de ratas fueron tratados con diferentes compuestos que sirvieron como controles positivos para los diversos biomarcadores evaluados (Tabla 3.2).

**Tabla 7.2.** Controles positivos

<b>Sustancia</b>	<b>Dosis (mmol/kg de p.c.)</b>	<b>Biomarcador</b>
Benceno (Ben)	128	MN en médula / CYP2E1
Dietilnitrosamina (DEN)	0.979	MN en hepatocitos
Tetracloruro de carbono (CCl <sub>4</sub> )	0.009	GSH/GSSG/MDA
Trans-stilbenóxido (tSO)	2.03	CYP450/GSTT1

### Vía de administración

Independientemente de la vía de exposición, el TOL, CLF y DCM, se distribuyen en el organismo y se metabolizan principalmente en hígado. Los efectos tóxicos de estos compuestos también son similares independientemente de la ruta de exposición, por ejemplo, el CLF produce aberraciones cromosómicas vía oral o intraperitoneal, también el TOL produce efectos neurotóxicos al administrarse de forma oral, i.p o inhalatoria.

En el presente estudio se eligió la ruta intraperitoneal porque de esta forma aseguramos la dosis que recibe cada animal, se evita el metabolismo de primer paso y aseguramos una mayor concentración hepática, de esta forma intentamos asegurar la máxima respuesta en lo que se refiere a genotoxicidad

### Tiempos de exposición

Con el objetivo de explorar diferentes escenarios de exposición se plantearon dos regímenes de exposición, dosis única y dosis repetida (1 dosis/24hrs/3días). Con el régimen de dosis única se intentó evaluar las primeras respuestas del organismo expuesto, y con el régimen de exposición de tres días se podría evaluar el efecto acumulado.

### Biomarcadores evaluados

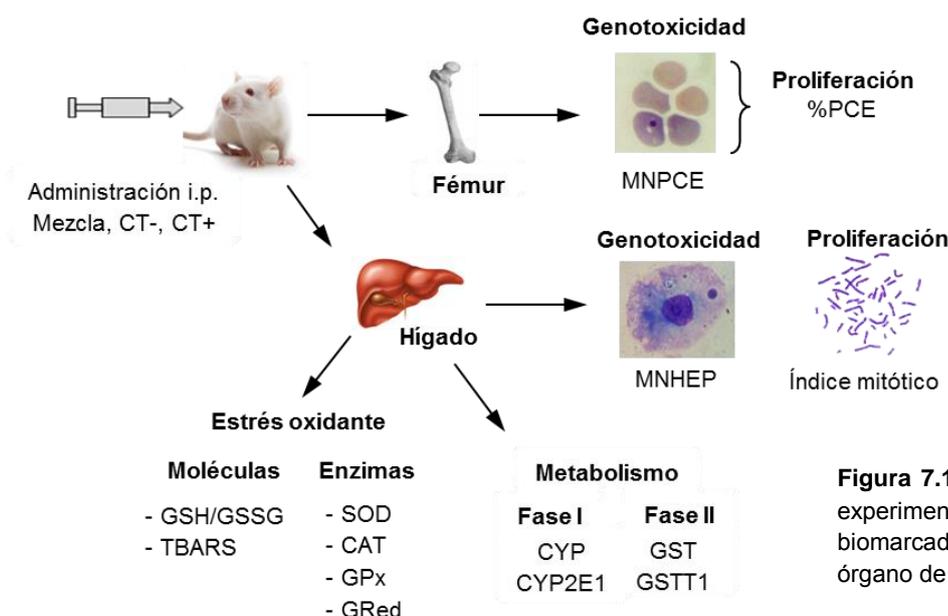
En este estudio se realizó una batería de pruebas para explorar el efecto de la mezcla de COVs, en la tabla 3.3 se resumen los biomarcadores evaluados.

**Tabla 7.3. Lista de biomarcadores evaluados en el estudio**

Parámetro	Biomarcador (órgano)
Metabolismo de xenobióticos	- Niveles de P450 totales (hígado) - Actividad CYP2E1(hígado) - Actividad GST total (hígado) - Actividad GSTT1 (hígado)
Estrés oxidante	- TBARS (hígado) - Actividad de enzimas antioxidantes (hígado): SOD, GPx, Gred, CAT - GSH/GSSG (hígado)
Genotoxicidad	- MNPCE (médula) - MNHEP (hígado)
Proliferación	- %PCE (médula) - Índice mitótico (hígado)

### Sacrificio y preparación de muestras

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 24hrs después de la última dosis de cada tratamiento. El hígado fue extirpado y enjuagado en KCl 0.15M frío. Dos pequeños fragmentos (0.25g aprox.) de cada hígado fueron obtenidos para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad por un lado y por otro los niveles de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG). El fragmento designado para la evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad fue colocado en 7mL de formalina amortiguada al 10% hasta su uso, y el fragmento para la cuantificación de GSH/GSSG se congeló en hielo seco. El hígado restante se utilizó para la preparación de fracción microsomal y citosólica. Adicionalmente se extrajo la médula ósea del fémur para la evaluación de genotoxicidad en este órgano (Fig.3.i).



**Figura 7.1.** Esquema de la estrategia experimental donde se ilustran los biomarcadores evaluados en cada órgano de interés.

## 8. Resultados

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan en unidades relativas, de tal forma que los grupos control tienen un valor unitario y la desviación estándar se tomó como el valor de la dispersión de los datos. A continuación se presentan los resultados de todas las condiciones de tratamiento.

### ➤ Estudio de los COV individuales

Con el objetivo de reproducir los datos reportados en la literatura, se expusieron ratas macho Wistar al 10% de la LD50 reportado para cada COV durante 3 días. Bajo este régimen de tratamiento, se esperaba un incremento en la actividad de CYP2E1 para el caso de TOL y CLF, pero no se esperaban cambios en el estrés oxidante (niveles de GSH), ni en el daño genotóxico (MNPCE) para ninguno de los COV. Como puede observarse en la tabla 5.1, el contenido de P450 y la actividad de CYP2E1 son los parámetros más sensibles a la exposición por TOL y CLF. Por un lado, los niveles de P450 totales disminuyen aproximadamente un 25% para el caso de TOL, sin embargo, la actividad de CYP2E1 se incrementa ~50%, para el caso de TOL y CLF, mientras que al analizar la razón CYP2E1/P450 tenemos una inducción específica de casi el doble para estos mismos COV. En el caso de las ratas expuestas a DCM, no se encontró ninguna diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados.

**Tabla 8.1.** Resumen de resultados de la exposición individual a los COV

Tratamiento	P450	CYP2E1	CYP2E1 / P450	GSH	MNPCE (‰)	%PCE
CT	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.28	1.5 ± 1.4	54.6 ± 18.0
CLF	0.80 ± 0.11	<b>1.47 ± 0.25*</b>	<b>1.84 ± 0.42*</b>	<b>1.41 ± 0.25*</b>	1.0 ± 0.7	54.3 ± 30.5
DCM	1.02 ± 0.14	1.28 ± 0.64	1.22 ± 0.58	1.15 ± 0.16	2.3 ± 1.6	59.5 ± 12.8
Tol	<b>0.74 ± 0.01*</b>	<b>1.54 ± 0.26*</b>	<b>2.05 ± 0.35*</b>	1.23 ± 0.30	1.4 ± 1.1	82.5 ± 5.27*

\*p<0.05 vs CT, prueba de t-Student

Los resultados de P450, CYP2E1, CYP2E1/P450 y GSH se están reportando en unidades relativas  
Los resultados de MNPCE y PCE se reportan en frecuencia (‰) y porcentaje (%) respectivamente

### ➤ Estudio con la mezcla de COV.

#### Enzimas del metabolismo de xenobióticos: Fase I y fase II

Los resultados correspondientes al efecto de la mezcla de COV sobre el metabolismo de fase I y II de xenobióticos se presentan en la tabla 5.2, adicionalmente se presentan las gráficas de los biomarcadores de mayor interés, donde se contrastan los resultados obtenidos a 24 y 72hrs (Fig. 5.1).

La actividad de las enzimas de fase I y fase II varía dependiendo del régimen de exposición, por un lado los niveles de P450 se mantienen constantes al exponer a los animales por única vez a la mezcla de COV, sin embargo, en exposición repetida los niveles de P450 muestran un efecto combinado, por un lado inducción en la dosis de 2.5% LD50 y por otro inhibición en la dosis de 10% LD50. En lo que respecta a la actividad de CYP2E1, se comporta similar a los niveles de P450, es decir, no hay cambios significativos en la actividad de CYP2E1 en el régimen de dosis única, pero en el régimen de dosis repetidas existe un incremento de la actividad en las dosis de 2.5 y 5% LD50 y para la dosis de 10% LD50, la actividad regresa a niveles basales.

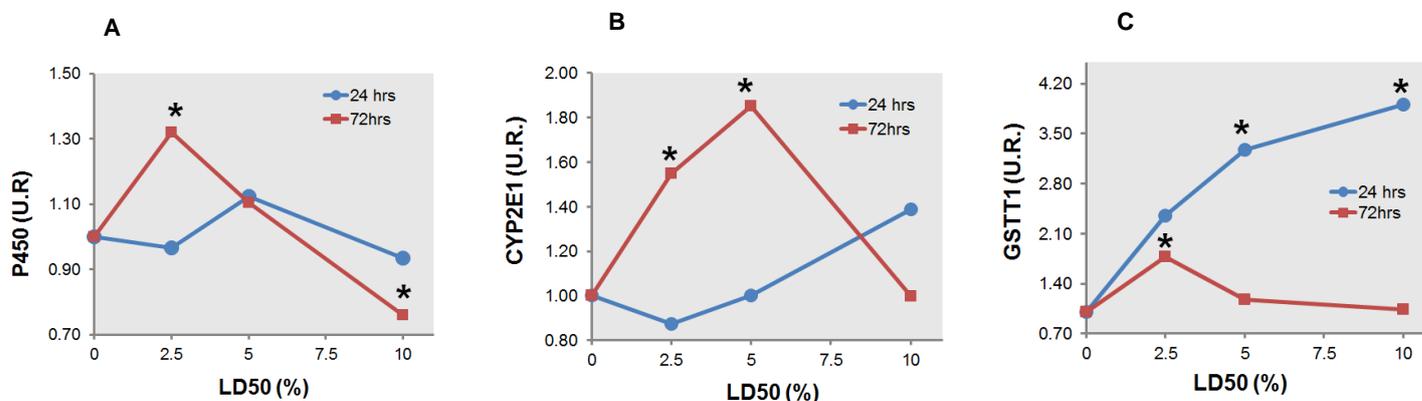
En cuanto a las enzimas de fase II, se puede observar que la mezcla de COV no induce la actividad de las GST totales, sin embargo, la isoforma GSTT1 se incrementa gradualmente hasta casi 4 veces cuando la exposición es única, mientras que en dosis repetidas, sólo hay una pequeña inducción en la dosis de 2.5% LD50.

**Tabla 8.2.** Enzimas del metabolismo de xenobióticos

Tratamiento	P450	CYP2E1	CYP2E1 / P450	GST	GSTT1
CT (24hrs)	1.00 ± 0.14	1,00 ± 0,15	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.15
Mez 2.5 (24hrs)	0.97 ± 0.10	0,87 ± 0,11	0.89 ± 0.13	<b>0.58 ± 0.17*</b>	2.35 ± 1.35
Mez 5 (24hrs)	1.12 ± 0.16	1,00 ± 0,12	0.89 ± 0.21	0.99 ± 0.13	<b>3.28 ± 0.67*</b>
Mez 10 (24hrs)	0.93 ± 0.16	1,39 ± 0,34	<b>1.44 ± 0.17*</b>	<b>0.73 ± 0.11*</b>	<b>3.91 ± 0.47*</b>
CT (72hrs)	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.27	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.32
Mez 2.5 (72hrs)	<b>1.32 ± 0.17*</b>	<b>1.55 ± 0.21*</b>	1.15 ± 0.18	0.99 ± 0.17	<b>1.77 ± 0.39*</b>
Mez 5 (72hrs)	1.10 ± 0.19	<b>1.85 ± 0.30*</b>	<b>1.63 ± 0.13*</b>	1.10 ± 0.14	1.18 ± 0.49
Mez 10 (72hrs)	<b>0.76 ± 0.15*</b>	1.00 ± 0.20	1.28 ± 0.17	1.07 ± 0.16	1.04 ± 0.33
tSO	<b>1.56 ± 0.12*</b>	<b>1.89 ± 0.09*</b>	1.17 ± 0.07	1.14 ± 0.12	<b>2.27 ± 0.54*</b>

\*p<0.05 vs CT, prueba de t-Student

Se utilizaron unidades relativas en todos los parámetros de la tabla



**Figura 8.1.** Tendencias en el comportamiento del metabolismo de xenobióticos. A) El P450 no muestra cambio alguno a las 24hrs de tratamiento, pero en dosis repetidas se observa un comportamiento muy complejo con inducción en dosis bajas e inhibición en dosis altas. B) El CYP2E1 muestra un comportamiento similar al P450, es decir, sin cambio a las 24hrs y en dosis repetidas hay inducción sólo en las dosis de 2.5 y 5 % de LD50. C) La actividad e GSTT1 se induce desde las 24hrs, sin embargo en el régimen de dosis repetidas sólo hay inducción en la dosis más baja

### Estrés oxidante

El estrés oxidante fue caracterizado utilizando varios biomarcadores lo que nos permitió evaluar el estrés a diferentes niveles. Los resultados correspondientes al estrés oxidante se presentan en la tabla 5.3, adicionalmente se presentan las tendencias gráficas de los resultados más significativos en la figura 5.2. En lo que respecta a las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y Gred), se puede observar que no muestran cambios en los tratamientos de 24hrs, sin embargo, en el régimen de dosis repetidas existe una tendencia a que estas enzimas disminuyan su actividad.

La disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes podría alterar el equilibrio redox celular, en particular, una disminución de la Gred podría ocasionar una alteración en la razón GSH/GSSG e inducir daño a macromoléculas. Los lípidos son algunas de las moléculas que pueden ser dañadas al alterarse el estado redox celular en un proceso denominado peroxidación lipídica, por lo que es de esperarse que si el sistema antioxidante se colapsa, se incrementen los niveles de peroxidación lipídica.

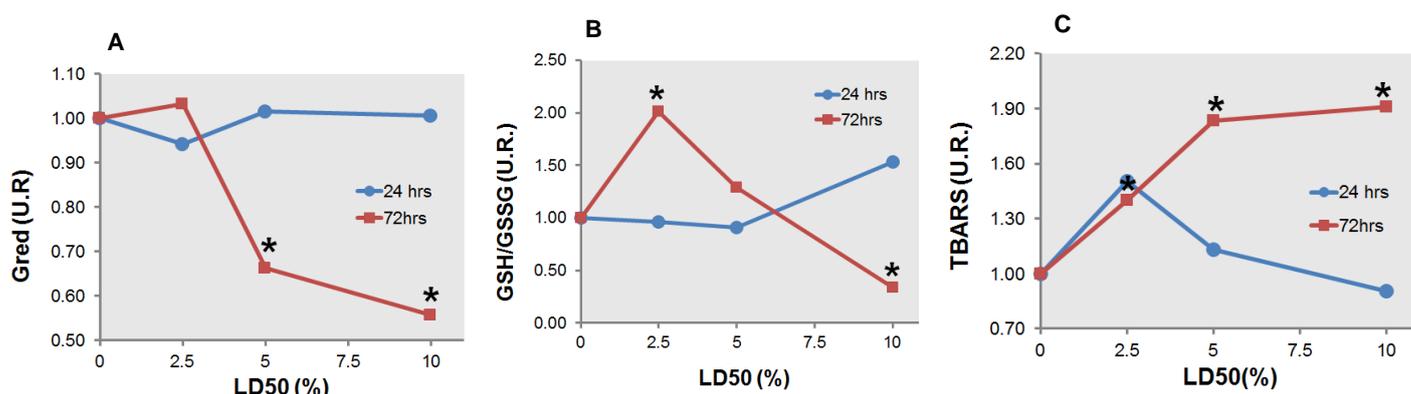
En los resultados presentados en la tabla 5.3 puede observarse que la razón GSH/GSSG no presenta ningún cambio en el régimen de 24hrs, sin embargo, a las 72 hrs de tratamiento se observa una caída, la coincide con la disminución en la actividad de Gred. En lo que respecta a los niveles de TBARS (biomarcador de peroxidación lipídica), no hay cambios significativos a las 24hrs pero comienza a incrementar desde las dosis más pequeñas en el régimen de 72hrs, alcanzando su nivel máximo cuando el sistema antioxidante celular se ve colapsado.

**Tabla 8.3.** Biomarcadores de estrés oxidante

Tratamiento		GSH	GSSG	GSH /GSSG	TBARS	SOD	GPx	Gred
CT	(24hrs)	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.56	1.00 ± 0.58	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.28	1.00 ± 0.09
Mez 2.5	(24hrs)	1.46 ± 0.31	1.31 ± 0.31	0.97 ± 0.29	1.50 ± 0.53	0.85 ± 0.18	0.78 ± 0.07	0.94 ± 0.10
Mez 5	(24hrs)	0.82 ± 0.27	0.98 ± 0.72	0.91 ± 0.43	1.13 ± 0.29	0.96 ± 0.22	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.15
Mez 10	(24hrs)	1.03 ± 0.38	1.05 ± 0.64	1.53 ± 1.74	0.90 ± 0.18	0.91 ± 0.15	1.03 ± 0.17	1.01 ± 0.13
CT	(72hrs)	1.00 ± 0.59	1.00 ± 0.49	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.27
Mez 2.5	(72hrs)	<b>2.29 ± 0.24*</b>	1.27 ± 0.52	<b>2.01 ± 0.72</b>	<b>1.40 ± 0.34*</b>	0.96 ± 0.11	<b>0.65 ± 0.07*</b>	1.03 ± 0.21
Mez 5	(72hrs)	1.12 ± 0.09	0.89 ± 0.18	1.29 ± 0.24	<b>1.83 ± 0.04*</b>	0.90 ± 0.03	0.88 ± 0.11	<b>0.66 ± 0.13*</b>
Mez 10	(72hrs)	1.03 ± 0.17	<b>3.68 ± 2.49*</b>	<b>0.34 ± 0.11</b>	<b>1.91 ± 0.29*</b>	0.83 ± 0.05	<b>0.62 ± 0.13*</b>	<b>0.56 ± 0.24*</b>
CCl <sub>4</sub>		1.53 ± 0.53	<b>3.61 ± 1.64*</b>	<b>0.43 ± 0.06</b>	<b>1.86 ± 0.13*</b>	0.84 ± 0.07	<b>0.61 ± 0.15*</b>	<b>0.39 ± 0.11*</b>

\*p<0.05 vs CT, prueba de t-Student

Se utilizaron unidades relativas en todos los parámetros de la tabla



**Figura 8.2.** Tendencias en los biomarcadores de estrés oxidante. A) La actividad de la glutatión reductasa (Gred) disminuyó aproximadamente 40% en 72hrs de tratamiento. B) La razón GSH/GSSG disminuyó significativamente a las 72hrs cuando la actividad de GRed fue más baja. C) Como consecuencia del colapso de las defensas antioxidantes (Gred y glutatión) es de esperar que el daño a biomoléculas incremente significativamente, y eso es lo que ocurre con las TBARS, que presentan el máximo incremento cuando las defensas antioxidantes están en el mínimo de capacidad.

### Genotoxicidad y proliferación

En la tabla 5.4 y en la figura 5.3, se presentan los datos de los biomarcadores utilizados para evaluar la genotoxicidad y la proliferación en médula ósea e hígado. Las primeras dos columnas contienen los datos correspondientes al hígado y las últimas dos columnas a la médula ósea.

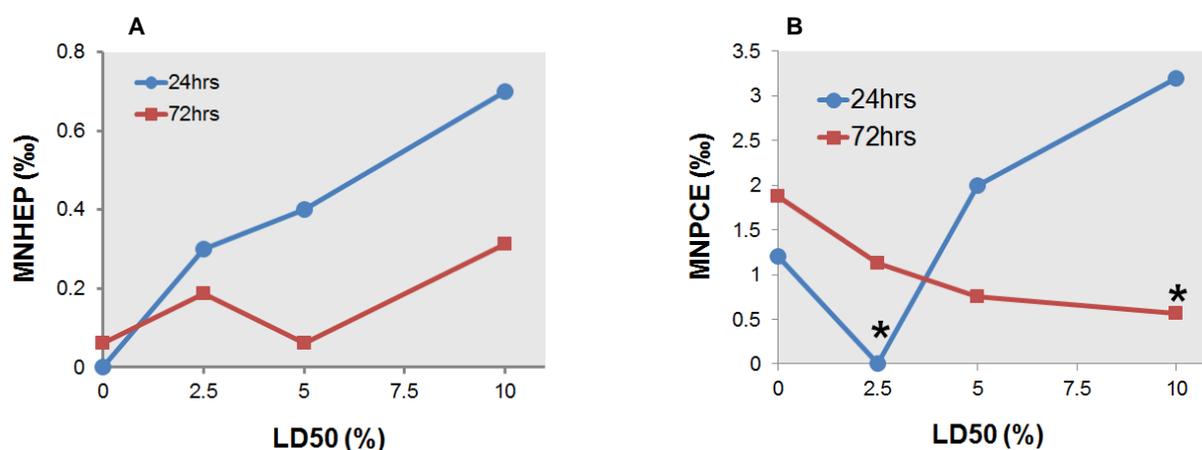
En lo que respecta a la genotoxicidad en hepatocitos, podemos observar que existe una tendencia a incrementar con la dosis, siendo en el régimen de 24hrs más marcada esta tendencia, sin embargo, la gran dispersión de los datos no permitieron observar diferencias significativas en los tratamientos. Analizando la frecuencia de metafases, podemos observar que hay una disminución significativa de la proliferación celular al tener dosis repetidas en la concentración más alta, esto podría explicar en parte porque la frecuencia de MNHEP es menor en el régimen de 72hrs

Sorpresivamente la frecuencia de MNPCE disminuyó significativamente en la dosis alta de la mezcla, lo que coincide con una disminución en %PCE, esto podría interpretarse como una ausencia de genotoxicidad debido a una disminución en la proliferación de la médula.

**Tabla 5.4.** Parámetros de genotoxicidad y citotoxicidad

Tratamiento	MNHEP (‰)	Metafases (‰)	MNPCE (‰)	%PCE
CT (24hrs)	0.00 ± 0.00	5.62 ± 3.71	1.20 ± 0.45	42.55 ± 8.44
Mez 2.5 (24hrs)	0.30 ± 0.45	3.90 ± 3.27	<b>0.00 ± 0.00*</b>	31.08 ± 12.29
Mez 5 (24hrs)	0.40 ± 0.65	2.00 ± 2.18	2.00 ± 1.41	43.64 ± 17.62
Mez 10 (24hrs)	0.70 ± 1.10	2.20 ± 1.10	3.20 ± 2.08	43.45 ± 7.87
CT (72hrs)	0.06 ± 0.18	2.29 ± 2.52	1.88 ± 1.27	53.58 ± 5.81
Mez 2.5 (72hrs)	0.19 ± 0.26	2.13 ± 1.25	1.13 ± 0.64	<b>40.23 ± 12.87*</b>
Mez 5 (72hrs)	0.06 ± 0.18	2.13 ± 4.88	0.75 ± 1.07	52.91 ± 2.80
Mez 10 (72hrs)	0.31 ± 0.46	<b>0.25 ± 0.46*</b>	<b>0.56 ± 0.50*</b>	<b>43.75 ± 11.83*</b>
DEN / Ben	<b>1.33 ± 1.41*</b>	9.75 ± 3.10	<b>5.16 ± 3.79*</b>	56.61 ± 2.39

p<0.05 vs CT, prueba de t-Student



**Figura 5.3.** Tendencias en los biomarcadores de genotoxicidad. A) Los micronúcleos en hígado muestran una tendencia a incrementar con la dosis, sin embargo, debido a la dispersión de los datos no se observa ninguna diferencia significativa. B) El daño genotóxico en la médula ósea muestra una tendencia a incrementar con la dosis, sin embargo no hay diferencias significativas. En lo que respecta a los tratamientos de 72hrs se observa una disminución del daño genotóxico, lo que puede ser explicado con la baja en la proliferación de la médula ósea (tabla 5.4).

## 9. Discusión

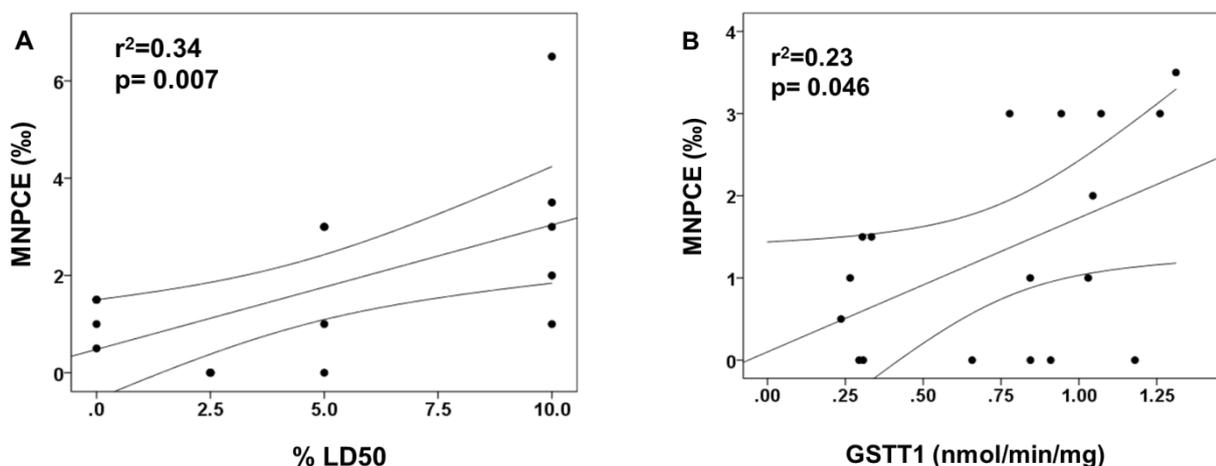
Con el objetivo de profundizar en la relación del metabolismo de xenobióticos, el estrés oxidante y la producción de micronúcleos en una co-exposición a CLF, TOL y DCM, se llevaron a cabo dos regímenes de exposición: un tratamiento por una sola ocasión y un régimen de tres días de tratamiento. Los dos regímenes produjeron un patrón de respuesta diferente en todos los parámetros evaluados.

### Tratamiento de un día

Bajo este régimen no se observaron cambios en la respuesta antioxidante y los biomarcadores de daño oxidante como TBARS y GSH/GSSG no se vieron alterados. Por otro lado, se registró una inducción en la actividad de las enzimas de fase I (CYP2E1) y II (GSTT1). Se ha descrito

que CYP2E1 está involucrada en el metabolismo oxidativo de los tres COV, mientras que GSTT1 participa en la bioactivación de DCM, produciendo un metabolito (S-clorometilglutión) que puede ser un genotóxico directo o que puede ser precursor del formaldehído, que es un conocido carcinogénico [54].

En lo que respecta al daño genotóxico, los MNPCE mostraron una tendencia significativa con la dosis, además los niveles de MNPCE correlacionaron con la actividad hepática de GSTT1 (Fig. 6.1). Cabe mencionar que GSTT1 fue el único parámetro hepático que correlacionó con MNPCE, esto se puede explicar de dos maneras: 1) la exposición a la mezcla de COV fue capaz de inducir la actividad de GSTT1 en la línea eritroide, lo que podría incrementar la bioactivación de DCM e inducir el daño genotóxico en la médula ósea [55], ó 2) la bioactivación de DCM se produjo en el hígado y el metabolito reactivo fue transportado por el torrente sanguíneo hasta la médula ósea, donde se llevó a cabo el daño genotóxico.



**Figura 6.1. Correlaciones de la frecuencia MNPCE en un día de tratamiento.** A) Correlación positiva entre la dosis y la frecuencia de MNPCE; B) Correlación positiva entre la actividad de GSTT1 y MNPCE.

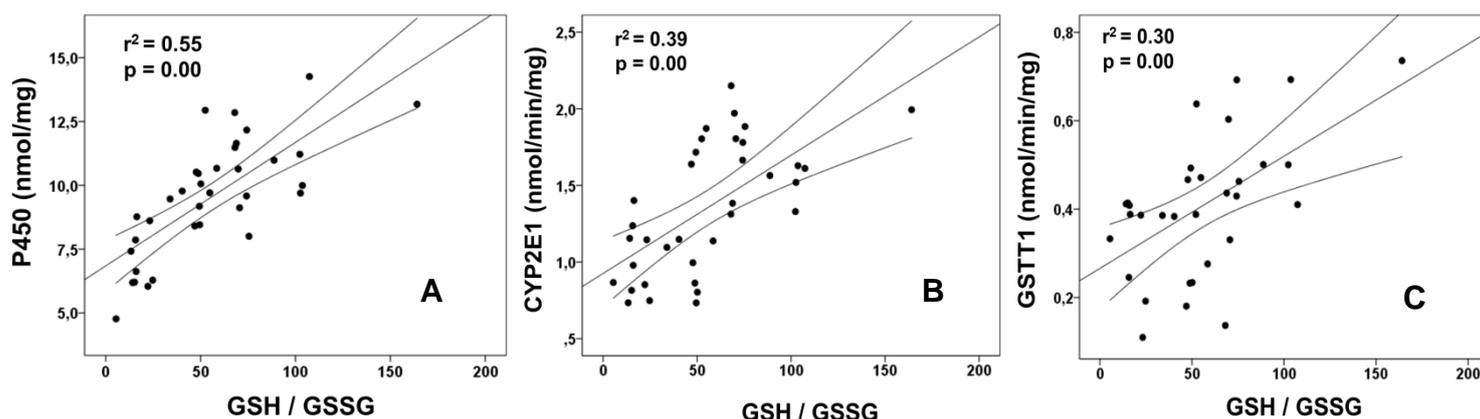
Hasta este punto, desconocemos si la bioactivación ocurrió en la médula ósea o en el hígado, sin embargo está bien descrito que la modulación de la actividad de GSTT1 afecta directamente el metabolismo del DCM, de tal forma que un incremento en la actividad de GSTT1 aumenta la bioactivación de DCM [56] y una disminución en la actividad de dicha enzima aumenta el metabolismo oxidante del DCM, favoreciendo su desintoxicación [57]; por lo tanto es razonable proponer que la correlación entre MNPCE y la actividad de GSTT1 se debe al metabolismo del DCM.

#### Tres días de tratamiento

En este régimen de tratamiento observó un efecto oxidante de la mezcla mucho más intenso que con el régimen de un día, se redujo la actividad de las enzimas antioxidantes Gred y GPx, además se incrementaron los niveles de TBARS y se observó una disminución de la razón GSH/GSSG en la dosis más alta de la mezcla. En estudios previos llevados a cabo con los compuestos individuales y bajo regímenes de exposición similares al presente estudio, no se encontró un incremento significativo en los biomarcadores de estrés oxidante, este hecho aunado a los resultados del estudio piloto donde no se observó cambio alguno en GSH con los COV individuales, nos llevan a concluir que el régimen de exposición repetida con la mezcla de COV exacerba el estrés oxidante.

En lo que respecta a las enzimas del metabolismo de xenobióticos, se mostró que existen dos comportamientos dependientes de la dosis. Por un lado en concentraciones bajas de la

mezcla, hubo una inducción de CYP450, CYP2E1 y GSTT1, sin embargo en concentraciones altas, la actividad regresó a niveles basales o incluso menores. Este comportamiento bifásico correlacionó con la razón de GSH/GSSG, lo que sugiere que el estrés oxidante puede modular a estas enzimas (Fig. 6.2). Estudios previos han encontrado que el metabolismo de xenobióticos y el estrés oxidante están estrechamente relacionados, por ejemplo, se sabe que los niveles de CYP450 disminuyen en condiciones de estrés oxidante intenso [58] y que GSTT1 puede ser inducida por Nrf2 un factor de respuesta al estrés. La correlación encontrada en este estudio puede ser casual o tener un sustento mecanístico, por lo que estudios diseñados para seguir las cascadas de señalización en condiciones de estrés oxidante deben ser llevados a cabo para sustentar la relación entre el estrés y el metabolismo.



**Figura 6.2. Correlaciones entre el estado redox (GSH/GSSG) y las enzimas del metabolismo de xenobióticos.** A) Correlación positiva GSH/GSSG y la concentración de P450; B) Correlación positiva entre la actividad de CYP2E1 y GSH/GSSG; C) Correlación positiva entre GSTT1 y GSH/GSSG.

En cuanto al daño genotóxico, no se encontró incremento en la formación de MNPCE, incluso se encontró una menor frecuencia en la dosis más alta, esto se explica en parte porque el porcentaje de PCE disminuyó significativamente, por lo que bajo este régimen de exposición se encontró evidencia de citotoxicidad pero no de genotoxicidad.

#### Estrés oxidante, genotoxicidad y proliferación

El papel que juegan las ERO en el daño genotóxico ha sido ampliamente estudiado, se sabe que estas especies de oxígeno pueden reaccionar con el material genético de diversas formas, oxidando directamente las bases nitrogenadas [59], dañando al esqueleto de desoxirribosa [60] o indirectamente con aductos derivados de la peroxidación lipídica [61]. Este daño oxidante al ADN puede derivar en efectos clastogénicos, lo que puede dar origen a micronúcleos [62]. Con estos antecedentes era de esperarse que en las condiciones de mayor estrés oxidante se observara un incremento en la frecuencia de micronúcleos en alguno de los tejidos, sin embargo los resultados muestran que no hay relación entre la frecuencia de micronúcleos, y el estrés oxidante producido por los COV probados en este estudio.

Para explicar estos resultados hay que profundizar en el mecanismo de formación de los micronúcleos. Cuando una sustancia reactiva (metabolitos electrofílicos y/o EROS) es capaz de producir eventos clastogénicos (rompimiento de cromosomas) o aneuploidogénicos (pérdida de cromosomas por disfunción del huso acromático) durante la mitosis, ocurre un rezago del material genético dañado. Al conformarse el núcleo de las células hijas el material genético rezagado es excluido del material genético nuclear y forma un pequeño corpúsculo denominado micronúcleo. Por lo tanto una condición necesaria para que se pueda visualizar el micronúcleo es la **proliferación** celular, entonces si la proliferación se ve disminuida, esto afectará la frecuencia de micronúcleos.

En nuestro estudio utilizamos dos modelos para evaluar el daño genotóxico en forma de micronúcleos, la médula ósea y el hígado. Estos tejidos fueron seleccionados por varias razones, la médula ósea tiene una alta capacidad proliferativa y evaluar los micronúcleos en reticulocitos es técnicamente muy sencillo, además existe un protocolo que ha sido probado internacionalmente y las condiciones experimentales están totalmente establecidas, adicionalmente era muy importante su estudio debido a que las enfermedades que aquejan a las poblaciones aledañas a los ríos Atoyac y Xochiac tienen su origen en la médula ósea. Sin embargo la gran desventaja de este modelo es que la capacidad metabolizadora de la médula es muy baja, por lo que los compuestos que requieren de la bioactivación para ejercer sus efectos tóxicos, difícilmente incrementarán la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea. Por otro lado utilizamos a los hepatocitos para complementar la evaluación de genotoxicidad, es decir el hígado tiene una gran capacidad metabólica y por tanto resulta ser un órgano muy atractivo dado que ahí es donde ocurre la bioactivación de los tres COV. Sin embargo, el hígado tiene una baja capacidad proliferativa, es por eso que se utilizaron ratas jóvenes (recién destetadas) donde el hígado sigue creciendo.

En los dos modelos de micronúcleos se observaron comportamientos similares, en condiciones de bajo estrés oxidante (régimen de 24hrs) hay una tendencia a que se incremente la frecuencia de micronúcleos, este incremento como se discutió anteriormente correlaciona con los procesos de bioactivación. Por otro lado en condiciones donde existe un estrés oxidante intenso (régimen 72hrs, dosis altas) existe una disminución significativa de la proliferación y por tanto una disminución en la frecuencia de micronúcleos.

El estrés oxidante puede modular la proliferación celular de varias formas, en modelos in vitro se ha observado que en concentraciones bajas de EROS puede haber una estimulación de la proliferación y al incrementar la concentración la proliferación se puede arrestar y posteriormente inducir muerte celular [63][64]. Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que la proliferación de los tejidos disminuyó en condiciones donde el sistema antioxidante (GSH y enzimas antioxidantes) colapsó, por lo que pudieron ocurrir eventos de arresto celular o de citotoxicidad, en ambos casos la frecuencia de micronúcleos se vería afectada.

## 10. Conclusiones

- ▣ Los compuestos orgánicos volátiles presentes en los ríos Atoyac y Xochiac no fueron genotóxicos bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio. Dado que el régimen de exposición fue diseñado para obtener la máxima respuesta de genotoxicidad y esto aunado al hecho de que en la literatura no hay consistencia en los estudios de genotoxicidad, podemos concluir que el potencial genotóxico de estos compuestos aún en mezcla es bajo. Por lo tanto debe existir algún otro factor independiente de esta mezcla que explique el incremento en la frecuencia de micronúcleos de los pobladores, por ejemplo, algún otro compuesto químico que no se haya cuantificado en los ríos, el estado nutricional de los pobladores, la exposición crónica y por tanto la acumulación de daño, etc.
- ▣ A pesar de que no se encontraron efectos genotóxicos significativos en este estudio, si se registraron otros efectos tóxicos que pudieran jugar un papel importante en la etiología de las enfermedades que aquejan a los pobladores de las zonas cercanas a las descargas industriales, por ejemplo, se observó que los COV presentes en los ríos pueden disminuir la proliferación de la médula ósea, lo cual podría explicar parte de las afecciones hematológicas (anemia y púrpura trombocitopénica) que presentan algunos pobladores.
- ▣ La co-exposición a tolueno, cloroformo y diclorometano produjo cambios en las enzimas del metabolismo de xenobióticos, en biomarcadores de estrés oxidante y en proliferación. Estos efectos no se observaron cuando la exposición se realizó con los compuestos individuales, lo que sugiere que existen interacciones de estos COV in vivo.
- ▣ El diseño experimental nos permitió evaluar la progresión de los efectos tóxicos de esta mezcla de COV y concluimos que la bioactivación de estos compuestos correlaciona con la genotoxicidad, mientras que el estrés oxidante afecta la proliferación celular.
- ▣ El caso de los ríos Atoyac y Xochiac es sólo una muestra de la realidad que viven los ríos en nuestro país, el deterioro ecosistémico es tan grave que rebasa a todas las pruebas científicas que se pudieran aportar en torno a este caso. Es urgente que las autoridades responsables de velar por la integridad de estos espacios, asuman su compromiso ético y legal para detener y revertir el impacto que la actividad industrial y doméstica ha tenido sobre la integridad de los ríos y el bienestar de sus habitantes.

## Referencias

- [1] U. S. G. Survey, "Global water distribution," 2014. [Online]. Available: <http://water.usgs.gov/edu/watercyclesummary.html>.
- [2] H. Curtis, *Biología*, 6ta en esp. Editorial Médica Panamericana, 2004, p. Capítulo 2, pag. 47.
- [3] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger. Principles of Biochemistry*, 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2004, p. 47.
- [4] M. Chaplin, "Do we underestimate the importance of water in cell biology?," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. November, pp. 861–866, 2006.
- [5] W. B. C. for Sustainable, "Facts and trends water," Switzerland, 2005.
- [6] P. Swinburn and J. Morrison, "Human perspectives on the global water crisis," 2010.
- [7] U. Nations, "UN news center," 2013. [Online]. Available: <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=45165#.VFupYcmDxws>.
- [8] S. de M. A. y R. N. (SEMARNAT) and C. N. del A. (CONAGUA), "Atlas del agua en México 2012," 2012.
- [9] S. de M. A. y R. N. (SEMARNAT) and C. N. del A. (CONAGUA), "Estadísticas del Agua en México," México, 2013.
- [10] S. de Economía, *ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES , RESIDUALES ( DBO 5 ) Y RESIDUALES TRATADAS*. México, 2001, p. 20.
- [11] S. de Economía, *ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES , RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS*. México, 2001.
- [12] S. de Economía, *NORMA MEXICANA NMX-AA-004-SCFI-2013 ANÁLISIS DE AGUA – MEDICIÓN DE SÓLIDOS SEDIMENTABLES EN AGUAS NATURALES , RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS*. México, 2013.
- [13] F. para la comunicación y la educación Ambiental, "En el olvido el Río Papaloapan," 2013. [Online]. Available: [http://www.agua.org.mx/h2o/index.php?option=com\\_content&view=article&id=23996:en-el-olvido-el-rio-papaloapan&catid=61:noticias-nacionales&Itemid=300054](http://www.agua.org.mx/h2o/index.php?option=com_content&view=article&id=23996:en-el-olvido-el-rio-papaloapan&catid=61:noticias-nacionales&Itemid=300054).

- [14] C. N. del A. (CONAGUA), "CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO PAPALOAPAN," 1999. [Online]. Available: [http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas\\_ambientales/compendio/02medio\\_ambiente/agua.shtml](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas_ambientales/compendio/02medio_ambiente/agua.shtml).
- [15] M. C. P. Rivera and E. M. Sierra, *Derecho al agua. Retos y perspectivas*. México, 2010, p. 140.
- [16] J. R. C. Duarte, "Derrame en el río Sonora : lo que sabemos y lo que no sobre el caso," 2014. [Online]. Available: <http://mexico.cnn.com/nacional/2014/08/28/derrame-en-el-rio-sonora-lo-que-sabemos-y-lo-que-no-sobre-el-caso>.
- [17] R. P. Schwarzenbach, T. Egli, T. B. Hofstetter, U. von Gunten, and B. Wehrli, "Global Water Pollution and Human Health," *Annu. Rev. Environ. Resour.*, vol. 35, no. 1, pp. 109–136, Nov. 2010.
- [18] UNICEF, "Agua , saneamiento e higiene." [Online]. Available: [http://www.unicef.org/spanish/wash/index\\_wes\\_related.html](http://www.unicef.org/spanish/wash/index_wes_related.html).
- [19] P. M. Glibert, D. M. Anderson, P. Gentien, E. Granéli, and K. G. Sellner, "The Global Complex Phenomena of Harmful algal Blooms," *Oceanography*, vol. 18, no. 2, pp. 130–141, 2005.
- [20] L. Jarup, "Hazards of heavy metal contamination," *Br. Med. Bull.*, vol. 68, no. 1, pp. 167–182, Dec. 2003.
- [21] R. P. Schwarzenbach, B. I. Escher, K. Fenner, T. B. Hofstetter, C. A. Johnson, U. von Gunten, and B. Wehrli, "The challenge of micropollutants in aquatic systems.," *Science*, vol. 313, no. 5790, pp. 1072–7, Aug. 2006.
- [22] E. F. V. y R. V. Navarro , I., *Ambiente y derechos humanos.Documentación y seguimiento de casos de Leucemia y Trombocitopenia por contaminación del río Atoyac, Puebla-Tlaxcala*. Puebla-Tlaxcala, 2004, p. 81.
- [23] L. L. Tirado-Gómez and A. Mohar Betancourt, "Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas," *Cancerología*, vol. 2, pp. 109–120, 2007.
- [24] SEDESOL, "Microrregiones," 2010. [Online]. Available: <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/>.
- [25] I. Navarro, E. Flores, and R. Valladares, *Ambiente y Derechos Humanos*. Tlaxcala (Mex): Centro Fray Julián Garcés, Derechos humanos y desarrollo local A.C., 2004, pp. 27–59.
- [26] Comisión de Medio Ambiente y recursos naturales, "Sistema de Información Legislativa," 2009. [Online]. Available:

[http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2010/03/asun\\_2635621\\_20100302\\_1267557483.pdf](http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2010/03/asun_2635621_20100302_1267557483.pdf).

- [27] R. Montero, L. Serrano, A. Araujo, V. Dávila, J. Ponce, R. Camacho, E. Morales, and A. Méndez, "Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: Comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes.," *Mutagenesis*, vol. 21, no. 5, pp. 335–342, Sep. 2006.
- [28] M. Fenech, M. Kirsch-Volders, a T. Natarajan, J. Surralles, J. W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D. a Eastmond, J. D. Tucker, and P. Thomas, "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells.," *Mutagenesis*, vol. 26, no. 1, pp. 125–32, Jan. 2011.
- [29] M. Fenech, "THE LYMPHOCYTE CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY AND ITS APPLICATION IN RADIATION BIODOSIMETRY," *Health Phys.*, vol. 98, no. 2, pp. 234–243, 2010.
- [30] G. Dianov, T. Timehenko, O. Sinitsina, A. Kuzminov, O. Medvedev, and R. Salganik, "Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation," *MGG Mol. Gen. Genet.*, vol. 225, no. 3, p. 1991, Mar. 1991.
- [31] M. Fenech and S. Neville, "Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 19, no. 1, pp. 27–36, 1992.
- [32] H. Norppa and G. C. Falck, "What do human micronuclei contain ?," *Mutagenesis*, vol. 18, no. 3, pp. 221–233, 2003.
- [33] M. G. Schueler and B. a Sullivan, "Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin.," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 7, pp. 301–13, Jan. 2006.
- [34] ATSDR, "TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CHLOROFORM," 1997.
- [35] R. M. Chester W. Spicer, Sydney M. Gordon, Thomas J. Kelly, Michael W. Holdren, *Hazardous Air Pollutant Handbook: Measurements, Properties, and Fate in Ambient Air*. Lewis publishers, 2002, pp. 55–65.
- [36] A. D. Nikolaou, S. K. Golfinopoulos, and T. D. Lekkas, "Formation of organic by-products during chlorination of natural," *J. Environ. Monit.*, vol. 4, pp. 910–916, 2002.
- [37] E. R. Blatchley, D. Margetas, and R. Duggirala, "Copper catalysis in chloroform formation during water chlorination," *Water Res.*, vol. 37, pp. 4385–4394, 2003.

- [38] A. D. NIKOLAOU, S. K. GOLFINOPOULOS, L. THEMISTOKLES, and G. B. D.ARHONDITSIS, "BY-PRODUCTS DURING WATER CHLORINATION :," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 159, pp. 357–371, 2004.
- [39] I. A. for R. on C. (IARC), "Agents Classified by the IARC Monographs , Volumes 1 – 110," 2012. [Online]. Available: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>.
- [40] U. EPA, "Ambient Water Quality Criterion for the Protection of Human Health : Chloroform - Revised Draft," no. EPA-822-R-04–002, pp. 1–63, 2003.
- [41] U. D. of H. and H. S. National Toxicology Program, "Choloform," 2011. [Online]. Available: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc12/index.html>.
- [42] Y.-M. Tan, K. H. Liao, R. B. Conolly, B. C. Blount, A. M. Mason, and H. J. Clewell, "Use of a physiologically based pharmacokinetic model to identify exposures consistent with human biomonitoring data for chloroform.," *J. Toxicol. Environ. Health. A*, vol. 69, no. 18, pp. 1727–56, Sep. 2006.
- [43] S. Gemma, E. Testai, P. Chieco, and L. Vittozzi, "Bioactivation, Toxicokinetics and Acute Effects of Chloroform in Fisher 344 and Osborne Mendel Male rats," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 24, pp. 203–210, 2004.
- [44] A. for T. S. and D. R. (ATSDR), "TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CHLOROFORM," 1997.
- [45] U. D. of H. and H. S. National Toxicology Program, "Dichloromethane," 2011. [Online]. Available: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc12/index.html>.
- [46] A. for T. S. and D. R. (ATSDR), "TOXICOLOGICAL PROFILE FOR METHYLENE CHLORIDE," 2000.
- [47] E. P. A. (EPA), "Toxicological Review of Dichloromethane," 2011.
- [48] A. for T. S. and D. R. (ATSDR), "TOXICOLOGICAL PROFILE FOR METHYLENE CHLORIDE," 2000.
- [49] P. M. J. Bos, M. J. Zeilmaker, and J. C. H. van Eijkeren, "Application of physiologically based pharmacokinetic modeling in setting acute exposure guideline levels for methylene chloride.," *Toxicol. Sci.*, vol. 91, no. 2, pp. 576–85, Jun. 2006.
- [50] R. Thier, F. a Wiebel, a Hinkel, a Burger, T. Brüning, K. Morgenroth, T. Senge, M. Wilhelm, and T. G. Schulz, "Species differences in the glutathione transferase GSTT1-1 activity towards the model substrates methyl chloride and dichloromethane in liver and kidney.," *Arch. Toxicol.*, vol. 72, no. 10, pp. 622–9, Oct. 1998.

- [51] A. for T. S. and D. R. (ATSDR), "TOXICOLOGICAL PROFILE FOR TOLUENE," 2000.
- [52] U. EPA, "Toxicological Review of Toluene," vol. EPA/635/R-, pp. 1–91, 2005.
- [53] T. Nakajima and R.-S. Wang, "Induction of cytochrome P450 by toluene," *Int. J. Biochem.*, vol. 26, no. 12, pp. 1333–1340, 1994.
- [54] I. A. for R. on C. (IARC), "Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Formaldehyde , 2-Butoxyethanol," Lyon, France, 2006.
- [55] A. E. Olvera-Bello, E. Estrada-Muñiz, G. Elizondo, and L. Vega, "Susceptibility to the cytogenetic effects of dichloromethane is related to the glutathione S-transferase theta phenotype.," *Toxicol. Lett.*, vol. 199, no. 3, pp. 218–24, Dec. 2010.
- [56] P. J. Sherratt, M. M. Manson, A. M. Thomson, E. A. M. Hissink, G. E. Neal, P. J. V. A. N. Bladeren, T. Green, and J. D. Hayes, "Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class Theta glutathione S-transferase T1-1," *Biochem. J.*, vol. 335, pp. 619–630, 1998.
- [57] S. J. Oh, S. K. Kim, and Y. C. Kim, "Role of glutathione in metabolic degradation of dichloromethane in rats," *Toxicol. Lett.*, vol. 129, pp. 107–114, 2002.
- [58] E. T. Morgan, "Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics.," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 85, no. 4, pp. 434–8, Apr. 2009.
- [59] G. Martinez, "Oxidative and alkylating damage in DNA," *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 544, no. 2–3, pp. 115–127, Nov. 2003.
- [60] W. K. Pogozelski and T. D. Tullius, "Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety.," *Chem. Rev.*, vol. 98, no. 3, pp. 1089–1107, May 1998.
- [61] H. Bartsch and J. Nair, "Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies.," *Mutat. Res.*, vol. 591, no. 1–2, pp. 34–44, Dec. 2005.
- [62] K. Sai, M. Hayashi, A. Takagi, R. Hasegawa, T. Sofuni, and Y. Kurokawa, "Effects of antioxidants on induction of micronuclei in rat peripheral blood reticulocytes by potassium bromate," *Mutat. Res.*, vol. 269, pp. 113–118, 1992.

- [63] K. J. A. Davies, "The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells : A New Paradigm for Oxidative Stress," *IUBMB ILfe*, vol. 48, pp. 41–47, 1999.
- [64] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, pp. 1–40, Mar. 2006.
- [65] E. P. A. (EPA), "Volatile Organic Compounds (VOCs). Technical Overview." [Online]. Available: <http://www.epa.gov/iaq/voc2.html#2>.
- [66] The Concil of the European Union (EU), *Council Directive 1999/13/EC*, vol. 54, no. March. 1999, pp. 1–25.
- [67] S. de M. A. y R. N. (SEMARNAT), *Norma que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles provenientes del proceso de los separadores agua-aceite de las refinerías de petróleo*. México, 1995.
- [68] D. Crump, "Review : Strategies and Protocols for Indoor Air Monitoring of Pollutants," *Indoor Built Environ.*, vol. 10, no. 3–4, pp. 125–131, May 2001.
- [69] W. H. O. (WHO), "Guidelines for indoor air quality," 2010.
- [70] W. H. O. (WHO), "Air Quality Guidelines: Global Update," WHO Regional Office for Europe, 2005.
- [71] WHO, "Indoor air quality: organic pollutants," Berlin, 1987.
- [72] E. P. A. (EPA), "Volatil Organic Compounds Emissions," 2005. [Online]. Available: <http://cfpub.epa.gov/eroe/index.cfm?fuseaction=detail.viewInd&lv=list.listByAlpha&r=209842&subtop=341>.
- [73] A. M. Evuti, "A Synopsis on Biogenic and Anthropogenic Volatile Organic Compounds Emissions : Hazards and Control," *Int. J. Eng. Sci.*, vol. 2, no. 5, pp. 145–153, 2013.
- [74] A. Steiner, C. Luo, Y. Huang, and W. . Chameides, "Past and present-day biogenic volatile organic compound emissions in East Asia," *Atmos. Environ.*, vol. 36, pp. 4895–4905, Oct. 2002.
- [75] J. Kesselmeier and M. Staudt, "Biogenic Volatile Organic Compounds ( VOC ): An Overview on Emission , Physiology and Ecology," *J. Atmos. Chem.*, vol. 33, pp. 23–88, 1999.
- [76] C. D. Klaassen, *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, Seventh Ed. McGraw-Hill, 2008, p. 1331.

- [77] B.-I. Yoon, G.-X. Li, K. Kitada, Y. Kawasaki, K. Igarashi, Y. Kodama, T. Inoue, K. Kobayashi, J. Kanno, D.-Y. Kim, T. Inoue, and Y. Hirabayashi, "Mechanisms of Benzene-Induced Hematotoxicity and Leukemogenicity: cDNA Microarray Analyses Using Mouse Bone Marrow Tissue," *Environ. Health Perspect.*, vol. 111, no. 11, pp. 1411–1420, 2003.
- [78] K. Krishnan and T. Peyret, "Physiologically Based Toxicokinetic (PBTK) Modeling in Ecotoxicology," in *Ecotoxicology Modeling*, vol. 2, J. Devillers, Ed. Boston, MA: Springer US, 2009.
- [79] A. F. Sasso, S. S. Isukapalli, and P. G. Georgopoulos, "A generalized physiologically-based toxicokinetic modeling system for chemical mixtures containing metals.," *Theor. Biol. Med. Model.*, vol. 7, p. 17, Jan. 2010.
- [80] D. Krewski, J. R. Withey, L. F. Ku, and M. E. Andersen, "Applications of physiologic pharmacokinetic modeling in carcinogenic risk assessment.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 102 Suppl , pp. 37–50, Dec. 1994.
- [81] M. H. Abraham, A. Ibrahim, and W. E. Acree, "Air to lung partition coefficients for volatile organic compounds and blood to lung partition coefficients for volatile organic compounds and drugs.," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 3, pp. 478–85, Mar. 2008.
- [82] N. I. for O. S. and H. (NIOSH), "SKIN EXPOSURES & EFFECTS," 2013. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/niosh/topics/skin/>.
- [83] W. H. O. (WHO), "DERMAL ABSORPTION," 2006.
- [84] L. A. Dethloff, "Route of administration and toxicity," in *Drug Toxicokinetics*, P. G. Welling and F. A. de la Iglesia, Eds. Marcel Dekker Inc., 1993, pp. 195–219.
- [85] V. Vasiliou, K. Vasiliou, and D. W. Nebert, "Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family.," *Hum. Genomics*, vol. 3, no. 3, pp. 281–90, Apr. 2009.
- [86] A. Galetin and J. B. Houston, "Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 318, no. 3, pp. 1220–9, Sep. 2006.
- [87] L. S. Kaminsky and Q.-Y. Zhang, "The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 31, no. 12, pp. 1520–5, Dec. 2003.
- [88] J. K. Nicholson, E. Holmes, and I. D. Wilson, "Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 5, pp. 431–8, May 2005.

- [89] M. Mikov, "The metabolism of drugs by the gut flora.," *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 19, no. 3, pp. 201–7, 1994.
- [90] H. G. Jeong, M. J. Kang, H. G. Kim, D. G. Oh, J. S. Kim, S. K. Lee, and T. C. Jeong, "Role of intestinal microflora in xenobiotic-induced toxicity.," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 84–99, Jan. 2013.
- [91] P. Paixão, L. F. Gouveia, and J. a G. Morais, "Prediction of drug distribution within blood.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 36, no. 4–5, pp. 544–54, Mar. 2009.
- [92] U. A. Boelsterli, "Bioactivation of xenobiotics to reactive metabolites," in *Mechanistic Toxicology. The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets*, 2nd ed., CRC Press, 2007, pp. 63–116.
- [93] C. J. Omiecinski, J. P. Vanden Heuvel, G. H. Perdew, and J. M. Peters, "Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities.," *Toxicol. Sci.*, vol. 120 Suppl , pp. S49–75, Mar. 2011.
- [94] F. P. Guengerich, "Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 14, no. 6, pp. 611–650, 2001.
- [95] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 and Chemical Toxicology," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 70–83, 2008.
- [96] M. Seliskar and D. Rozman, "Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1770, no. 3, pp. 458–66, Mar. 2007.
- [97] F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, and R. Bernhardt, "Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1770, no. 3, pp. 330–44, Mar. 2007.
- [98] S. E. Kandel and J. N. Lampe, "Role of Protein-Protein Interactions in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism and Toxicity.," *Chem. Res. Toxicol.*, Aug. 2014.
- [99] D. Werck-reichhart and R. Feyereisen, "Protein family review Cytochromes P450 : a success story," *Genome Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. 1–9, 2000.
- [100] T. Omura and R. Sato, "The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes," *J. Biol. Chem.*, vol. 239, no. 7, pp. 2370–2378, 1964.
- [101] R. C. Zangar, D. R. Davydov, and S. Verma, "Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450.," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 199, no. 3, pp. 316–31, Sep. 2004.

- [102] S. M. Cohen and L. L. Arnold, "Chemical carcinogenesis.," *Toxicol. Sci.*, vol. 120 Suppl , pp. S76–92, Mar. 2011.
- [103] N. Trushin, S. Alam, K. El-Bayoumy, J. Krzeminski, S. G. Amin, J. Gullett, C. Meyers, and B. Prokopczyk, "Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes.," *J. Carcinog.*, vol. 11, pp. 1–9, Jan. 2012.
- [104] P. Jancova, P. Anzenbacher, and E. Anzenbacherova, "Phase II drug metabolizing enzymes.," *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, vol. 154, no. 2, pp. 103–16, Jun. 2010.
- [105] P. J. Sherratt and J. D. Hayes, "Glutathione S-transferases," in *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*, vol. 4, I. Costas, Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2001, pp. 319–352.
- [106] W. Wei and B. Nazzareno, "Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions," *Pharmacol. Rev.*, vol. 50, no. 3, pp. 335–355, 1998.
- [107] P. B. Inskeep and F. P. Guengerich, "Glutathione-mediated binding of dibromoalkanes to DNA: specificity of rat glutathione-S-transferases and dibromoalkane structure.," *Carcinogenesis*, vol. 5, no. 6, pp. 805–8, Jun. 1984.

## ANEXOS

### Anexo 1. Compuestos orgánicos volátiles

#### ➤ Definición

En la literatura existen dos definiciones para los compuestos orgánicos volátiles (COV) dependiendo del contexto en el que se use la definición.

- 1) Los COV pueden ser definidos como compuestos de carbono (con excepción de CO, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) cuya composición hace posible que se evaporen bajo condiciones atmosféricas normales de temperatura y presión [65][66]. Esta es la definición general de COV y es comúnmente utilizada para evaluar la calidad de la **atmósfera intramuros**.
- 2) Los COV también son definidos como cualquier compuesto de carbono, (con excepción de CO, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) que participa en reacciones fotoquímicas. Esta definición se utiliza en la evaluación de la calidad **atmosférica extramuros** [65].

Las normas mexicanas se han basado en la segunda definición de COV para evaluar la calidad del aire y normar los niveles de contaminantes, por ejemplo, en la NOM-075-ECOL-1995 [67] se define a los COVs como “sustancias químicas constituidas principalmente por hidrocarburos volátiles que participan en reacciones fotoquímicas en la atmósfera contribuyendo a la formación de ozono”.

Es importante destacar la diferencia entre la calidad atmosférica intramuros y extramuros para entender el contexto de las dos definiciones expuestas. El ambiente intramuros se refiere a lugares cerrados donde ocurre la exposición, por ejemplo en el hogar, en oficinas, dentro de las industrias, etc. En estos lugares las personas se exponen a diversos compuestos químicos que se liberan en el aire debido al recubrimiento del inmobiliario (pinturas y/o barnices), o a las prácticas propias que se lleven a cabo dentro del inmueble, por ejemplo, al utilizar desodorantes, pesticidas, manejo de solventes, etc. La importancia de caracterizar este ambiente radica en que los contaminantes que se liberan de forma intramuros pueden llegar a alcanzar concentraciones que pueden ser nocivas para las personas que se encuentran ocupando estos espacios [68][69].

Por otro lado el ambiente extramuros se refiere al espacio abierto, fuera de cualquier construcción. En este tipo de ambiente, las principales fuentes de emisión son los automóviles que utilizan hidrocarburos y las industrias que expulsan sus desechos a través de chimeneas [70]. En este caso los contaminantes liberados pueden alcanzar concentraciones nocivas para el ser humano pero también pueden modificar la composición química de la atmósfera, lo cual puede tener un impacto a nivel global, por ejemplo al destruir la capa de ozono. Por lo tanto la definición de COV para calidad del aire extramuros hace especial énfasis en los compuestos en estado gaseoso que pueden reaccionar con los componentes de la atmósfera y producir efectos adversos [65].

#### ➤ Clasificación de los COV

##### Clasificación de los COV según su volatilidad

La OMS ha clasificado a los COV como muy volátiles (VVOC), volátiles (VOC), semivolátiles (SVOC) y no volátiles (NVOC), esta clasificación está basada en la facilidad de un compuesto orgánico para entrar en fase gaseosa. La OMS utilizó el punto de ebullición como un parámetro fisicoquímico que refleja la “volatilidad” de un compuesto[71], sin embargo un parámetro que indica de mejor manera la volatilidad es la presión de vapor, por lo que C. Spicer [35] *et al* en 2002 modificó la tabla original (**Tabla 1.1**)

**Tabla 1.1. Clasificación de los COV de acuerdo con su volatilidad (modificada de C. Spicer et al. 2002)[35]**

Clasificación de volatilidad	Intervalo de presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Presentación en atmósfera	Ejemplos
Muy volátiles	>380	Vapor	Acetaldehído Diclorometano
Volátiles	0.1 a 380	Vapor	Tolueno Cloroformo
Semivolátiles	10 <sup>-7</sup> a 0.1	Vapor o Partícula	Bifenilo Naftaleno
No volátiles	< 10 <sup>-7</sup>	Partícula	2-Acetilaminofluoreno

Una característica valiosa de esta clasificación es que nos permite predecir si el contaminante de interés se va a encontrar en la atmósfera principalmente de forma libre en estado gaseoso o si se va a encontrar primordialmente asociado a partículas.

Clasificación de los COV según su fuente de emisión

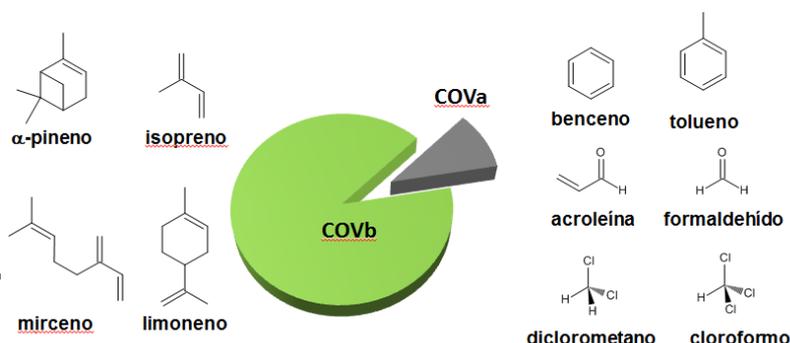
Los COV también son clasificados en la literatura según su fuente de emisión, las cuáles pueden ser naturales y/o antropogénicas. Se estima que las emisiones de origen biogénico representan cerca del 80% del total de emisiones anuales de COV, sin embargo las emisiones relativas varían de región en región según el nivel de actividad industrial, clima y vegetación (Fig. 1.1) [72][73][74].

Los COV de origen biogénico (COVb) más abundantes son el isopreno y una amplia gama de monoterpenoides cuyas emisiones dependen de condiciones ambientales como la temperatura y la luz que reciben las plantas[75]. Por otro lado los COV de origen antropogénico (COVa) son emitidos principalmente en procesos químicos industriales, por ejemplo, durante la producción de pinturas, lubricantes, adhesivos, derivados del petróleo, etc. Además de la actividad industrial, existen otras actividades humanas que contribuyen a la emisión de COVa, por ejemplo la quema de combustibles fósiles, el uso de solventes, la aplicación de pesticidas en la agricultura, etc [73].

Desde el punto de vista de la toxicología se consideran más peligrosos los COVa que los COVb [73], sin embargo, si consideramos que en masa las emisiones de COVb son mucho mayores a las de COVa y que estructuralmente pueden ser igualmente complejos, incluso algunos organismos y/o procesos naturales (Ej. erupción de volcanes) producen exactamente las mismas moléculas, entonces surge la pregunta ¿por qué son de mayor interés toxicológico los COVa?

Para responder a esta pregunta hay que considerar que el ser humano ha evolucionado junto con los COVb, lo que ha dado como resultado la selección de sistemas celulares capaces de desintoxicar satisfactoriamente a estas moléculas, sin embargo las actividades humanas de producción masiva y diversos estilos de vida (Ej. fumar, consumo de alcohol, abuso de solventes, etc.) han expuesto al ser humano a moléculas altamente reactivas a niveles que comprometen la salud humana e incluso al equilibrio de los ecosistemas [73].

**Figura 1.1.** A pesar de que las emisiones de COV biogénicos (COVb) son mucho mayores a las emisiones de COV antropogénicos (COVa), se consideran de mayor importancia toxicológica los COVa ya que comprometen la salud humana y la integridad ecológica



## ➤ Toxicología de los COV.

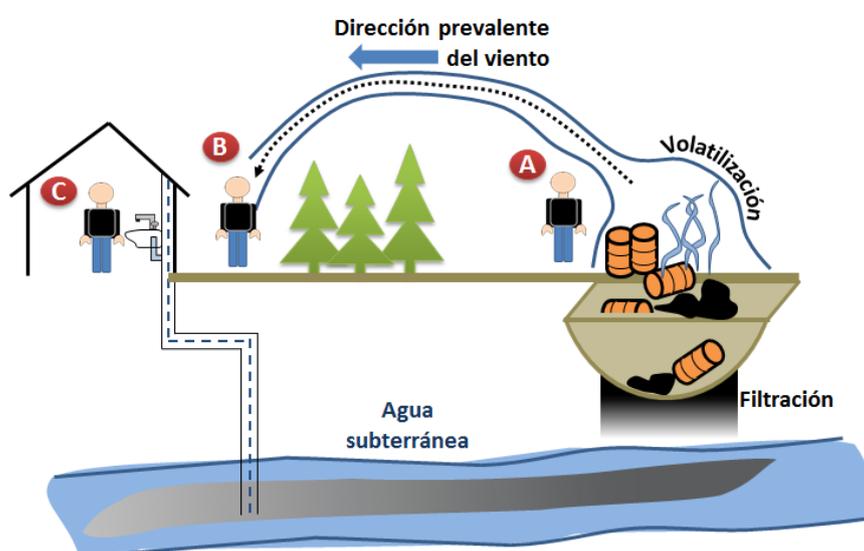
### Propiedades fisicoquímicas

En general los COV son moléculas lipofílicas, con puntos de ebullición bajos (50-260°C) y de bajo peso molecular, sin embargo, los COV poseen estructuras muy diversas, con distintos grupos funcionales y propiedades químicas particulares. Dentro de las estructuras más comunes de COV se encuentran compuestos alifáticos, aromáticos, halogenados, alcoholes y aldehídos [69][35].

### Rutas de exposición

Debido a su alta volatilidad, los COV son capaces de esparcirse en la atmósfera y recorrer grandes distancias desde el punto inicial de emisión, por lo tanto la vía de exposición principal para los COV es la vía aérea [76]. Los COV también pueden filtrarse hasta los mantos freáticos y contaminar el agua subterránea, por lo que la exposición a los COV también puede ser vía oral (al ingerir agua contaminada) o dérmica (al bañarse con agua contaminada) (Fig. 1.2).

**Figura 1.2. Rutas, puntos y vías de exposición a los COV.** [76] **(A)** Durante el proceso de volatilización, los COV entran en fase gaseosa, alcanzando elevadas concentraciones en el punto de emisión donde pueden ser evaluados. **(B)** Las corrientes de viento pueden transportar a los COV, provocando que poblaciones humanas estén expuestas aún a distancias considerables del punto de emisión, también por emisión o por contacto dérmico. **(C)** Algunos COV son capaces de filtrarse hasta los mantos freáticos y contaminar el agua potable, por lo que la exposición puede ocurrir por vía oral y/o dérmica.



### Modelos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME)

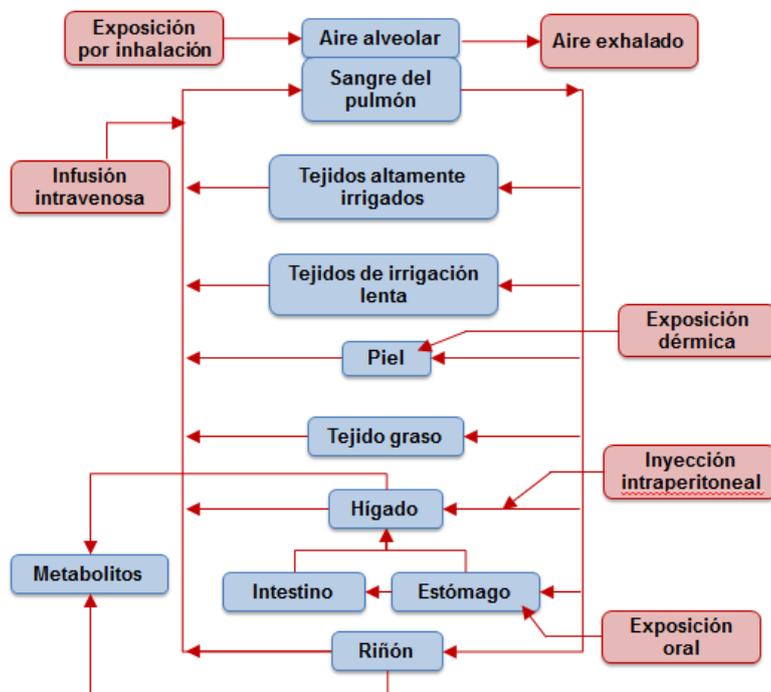
Una vez que ocurre la exposición, los compuestos químicos son absorbidos en el organismo, esto implica su distribución a los diferentes tejidos a través del torrente sanguíneo. Por lo tanto, a pesar de que la exposición principal de los COV es vía aérea, éstos pueden ocasionar efectos nocivos en diferentes órganos y no sólo al sistema respiratorio. Un ejemplo de esta situación es el benceno, el cual después de ser inhalado, llega al hígado (a través de la sangre) donde es metabolizado y posteriormente sus metabolitos llegan a la médula ósea donde pueden causar severos daños hematotóxicos [77].

Con la finalidad de comprender los procesos que sigue un agente químico desde que ingresa al organismo hasta que sale de él, se han desarrollado modelos toxicocinéticos, los cuáles son una abstracción de los procesos que ocurren en el organismo cuando se expone a un agente extraño (xenobiótico) [76][78][79]. En la figura 1.3 se representa un diagrama clásico de un modelo toxicocinético donde se consideran los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME), cada recuadro o compartimento representa un órgano o conjunto de órganos que pueden ser expuestos a un xenobiótico una vez que entra al organismo.

Estos modelos son de gran utilidad en toxicología porque ayudan a realizar predicciones acerca de las concentraciones en sangre que pueden alcanzar un xenobiótico o sus metabolitos y comprender los mecanismos tóxicos a nivel sistémico o en algún órgano en particular [80].

**Figura 1.3. Modelo toxicocinético basado en los procesos ADME.**

Los modelos toxicocinéticos representan el flujo dinámico de un xenobiótico a través del organismo, dicho flujo está íntimamente relacionado con los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME). En este esquema se representan las vías de exposición con recuadros rojos y los órganos de interés se representan en recuadros azules.

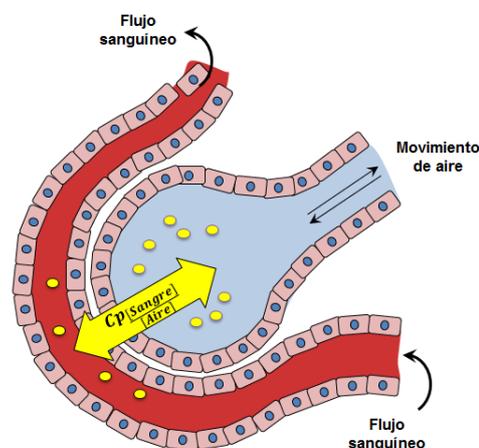


### Absorción

El término de absorción se refiere al movimiento de los tóxicos a través de alguna vía de exposición (enteral o parenteral), hacia el torrente sanguíneo. La absorción de los COV inhalados ocurre principalmente en los alveolos. Una vez que los COV llegan a los alveolos, se lleva a cabo un equilibrio casi instantáneo con la sangre en los capilares pulmonares. El coeficiente de partición (CP) sangre/aire es un factor determinante en el grado de absorción de los COV. El término de CP se refiere a la razón en la concentración del COV que existe entre dos diferentes medios en el equilibrio, mientras mayor sea el CP, mayor será la absorción del compuesto (Fig. 1.4) [76][81].

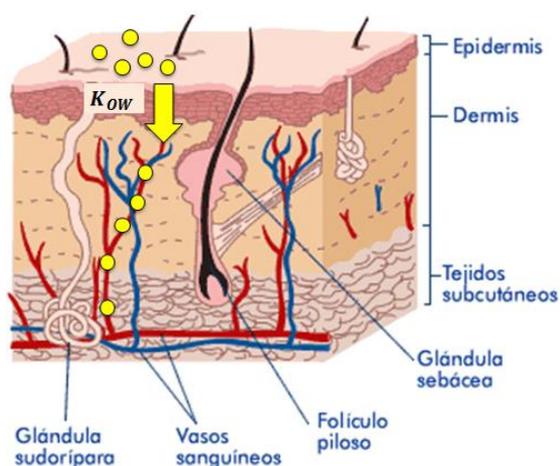
**Figura 1.4. Absorción de los COVs en los alveolos.** La principal vía de exposición a los COVs es la vía aérea, por lo que estos contaminantes ingresan en el organismo durante la inhalación. Los COV son absorbidos en los alveolos, donde llegan al torrente sanguíneo a través de los capilares pulmonares. Un parámetro matemático que indica la facilidad con que un COV es absorbido es el coeficiente de partición (CP), el cual se define como:  $CP = \frac{[COV]_{Sangre}}{[COV]_{Aire}}$

Mientras mayor es el valor de CP, la absorción del COV será mayor también.



Debido a que los COV pueden contaminar las fuentes de agua potable, existen dos rutas de exposición adicionales a la ruta aérea: la exposición dérmica y la ingestión. El paso limitante de la absorción dérmica es en general el estrato córneo (capa más externa de la epidermis), todos los tóxicos que se mueven a través de esta capa, lo hacen por difusión pasiva [82]. En general, los COV lipofílicos se absorben fácilmente a través del estrato córneo, mientras que la penetración de los COV hidrofílicos será más limitada. Un parámetro importante utilizado en la toxicología para predecir la capacidad de un tóxico para atravesar el estrato córneo, es la constante de partición octanol / agua ( $K_{OW}$ ), en general a mayor valor de  $K_{OW}$ , mayor es la absorción de un tóxico por vía dérmica (Fig. 1.5) [83].

Existen varios factores determinantes en la velocidad de absorción dérmica, por ejemplo, la concentración del COV, la superficie de área expuesta, el tiempo de exposición, la temperatura ambiental, hidratación, integridad y grosor del estrato córneo, etc [83].



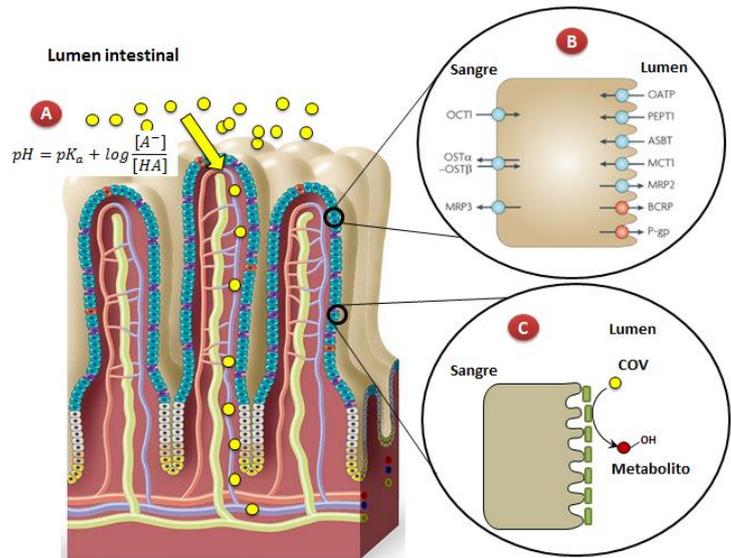
**Figura 1.5. Absorción de los COV vía dérmica.** El paso limitante para la absorción dérmica de un tóxico, es el transporte pasivo a través del estrato córneo. La lipofilicidad del agente químico es una propiedad que favorece el proceso de absorción. Una forma cuantitativa de determinar la lipofilicidad de una sustancia es la constante de partición ( $K_{OW}$ ), en general, a mayor valor de  $K_{OW}$ , mayor será la absorción vía dérmica del contaminante.

La absorción de los COV en el tracto digestivo es mucho más compleja que la vía aérea o la vía dérmica. Uno de los factores limitantes para que los tóxicos se absorban por la vía gástrica es la ionización de la molécula, de tal forma que si el tóxico tiene carga, entonces no puede absorberse por difusión pasiva. Si el COV tiene propiedades ácido-base, entonces será absorbido por difusión pasiva en la región del tracto digestivo donde presente su forma liposoluble (no ionizada). De acuerdo con esto, los COV que sean ácidos débiles serán absorbidos predominantemente en el estómago, en contraste, las bases débiles serán absorbidas predominantemente en el intestino [84].

En el intestino también existen una serie de proteínas que conforman el sistema de transporte activo, en el cual moléculas hidrosolubles y/o cargadas son transportadas hacia el torrente sanguíneo. Estos transportadores se distribuyen de forma asimétrica y diferencial a lo largo del tracto digestivo. En muchos casos este transporte es el paso limitante para la absorción de los agentes tóxicos, en algunas ocasiones estos transportadores tienen el efecto de evitar que los tóxicos lleguen al torrente sanguíneo al expulsarlos hacia el lumen intestinal [85].

El último factor a considerar en la absorción gástrica es el metabolismo que puede ocurrir en el intestino, en algunos casos este metabolismo es capaz de eliminar a los agentes tóxicos antes de que lleguen a torrente sanguíneo. Este metabolismo puede llevarse a cabo por los enterocitos [86][87] o por la flora intestinal del intestino [84][88]–[90]. A este fenómeno del metabolismo de agentes tóxicos antes de la absorción se le denomina “efecto de primer paso” (Fig. 1.6).

**Figura 1.6. Absorción de los COV vía intragástrica.** Existen al menos tres procesos involucrados en la absorción de COV por la vía oral. **(A)** Difusión pasiva. En este tipo de transporte las moléculas no cargadas (lipofílicas) pueden ser absorbidas. La ecuación de Henderson-Hasselbach es de utilidad para predecir el sitio de absorción, cuando los COV tienen propiedades ácido-base. **(B)** Otro medio por el cual los agentes tóxicos pueden ser transportados en el intestino son los sistemas de transporte activo, los cuales dependen de energía (ATP) para regular el transporte de sustancias tóxicas. **(C)** La microbiota intestinal también juega un papel fundamental en la absorción de tóxicos, esto se debe a que estas bacterias pueden metabolizar algunos tóxicos y eliminarlos antes de que entren a torrente sanguíneo, o activarlos y así entran a torrente sanguíneo.



### Distribución

Una vez absorbidos, los COV se distribuyen en el organismo a través del torrente sanguíneo, a todos los órganos, ejerciendo sus efectos tóxicos en los órganos que más se acumulen o en donde puedan ser bioactivados. Por su naturaleza lipofílica, generalmente los COV son transportados en el torrente sanguíneo unidos a lipoproteínas, por lo que no están biodisponibles en sangre, sin embargo pueden ser absorbidos por algunas células y de esa forma iniciar un proceso tóxico [91]

## **Anexo 2. Metabolismo de xenobióticos**

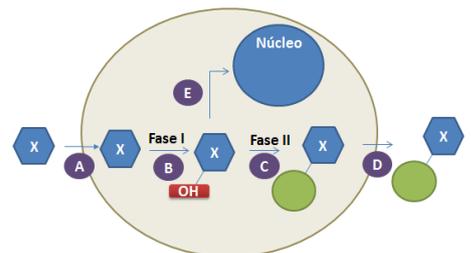
### Metabolismo

Debido a su lipofilicidad, los COV no son fácilmente eliminados del organismo, por lo que es necesario su metabolismo para aumentar su hidrofiliidad y de esta forma facilitar su excreción. El organismo cuenta con diversos sistemas enzimáticos para metabolizar a los COV, estos mismos sistemas metabolizan otras moléculas ajenas al organismo como fármacos, drogas, plaguicidas, etc. Al conjunto de procesos metabólicos que participan en la desintoxicación de moléculas ajenas al organismo, se le denomina **metabolismo de xenobióticos** [76][92].

En general podemos dividir el metabolismo de xenobióticos en dos fases, la fase I se refiere a reacciones de oxidación / reducción, y las reacciones de fase II (o fase de conjugación) comprenden la condensación del xenobiótico con una biomolécula [93]. El orden en que ocurren las fases usualmente es secuencial, es decir, la oxidación o reducción precede a la fase de conjugación, sin embargo, esto depende de cada xenobiótico en particular.

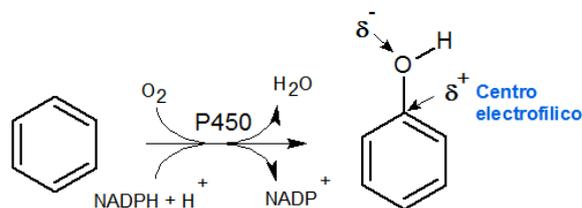
El metabolismo de los xenobióticos puede traer dos consecuencias, por un lado incrementar la hidrofiliidad del tóxico y favorecer su excreción o incrementar su reactividad y favorecer su toxicidad (proceso de bioactivación) (Fig.1.7)[92].

**Figura 1.7. Metabolismo de xenobióticos.** El metabolismo de xenobióticos comprende varias etapas: (A) El xenobiótico debe ser transportado desde el torrente sanguíneo hasta el interior de la célula, este proceso es usualmente por difusión pasiva por la naturaleza hidrofóbica del xenobiótico. (B) La fase I del metabolismo comprende reacciones redox, estas reacciones “activan” a la molécula original y la “preparan” para la fase II. (C) En esta fase el metabolito de fase I es conjugado con una biomolécula, lo cual le confiere un incremento en la hidrofiliidad y promueve su excreción. (D) El metabolito conjugado es transportado enzimáticamente fuera de la célula para finalmente ser excretado. (E) El metabolito oxidado resultado de la fase I es en algunas ocasiones una molécula muy reactiva que incluso puede dañar biomoléculas, a este proceso se le denomina bioactivación.



Las reacciones de fase I comprenden oxidación, reducción e hidrólisis y existen diversos sistemas enzimáticos que llevan a cabo (Tabla 1.2). En general, las reacciones de fase I modifican la estructura de los xenobióticos e introducen un grupo funcional, esto implica un cambio en la polaridad de la molécula, lo que origina un centro electrofílico reactivo (Fig. 1.8) [76].

**Figura 1.8. Formación del centro electrofílico.** En la figura se muestra el primer paso del metabolismo del benceno, que se lleva a cabo por enzimas de citocromo P450. El metabolito resultante (fenol) posee un centro electrofílico el cuál es muy importante para que se lleven a cabo reacciones de conjugación (fase II) o de bioactivación.



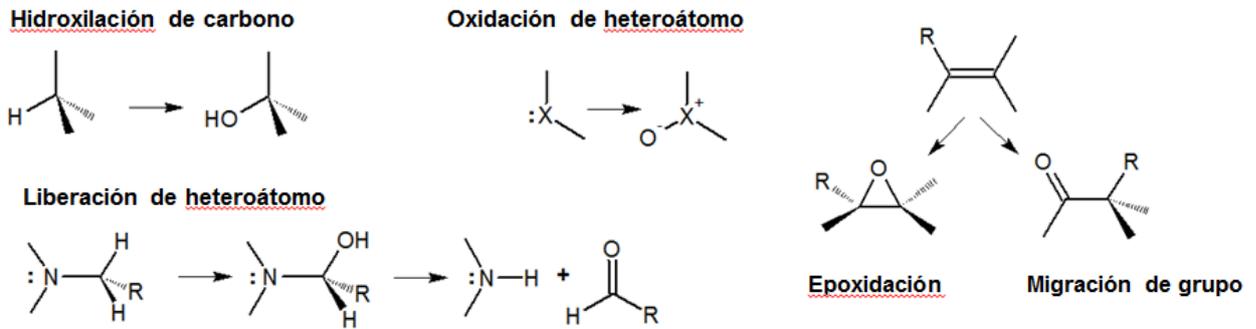
**Tabla 1.2.** Principales familias de enzimas que participan en las reacciones de fase I [76]

Enzimas de Fase I	Localización subcelular	Reacción general
Citocromos P450 (P450)	REL <sup>a</sup>	$\text{O}_2 + \text{RH} \xrightarrow[\text{NADPH} + \text{H}^+]{\text{P450 / MFO}} \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$
Monooxigenasas dependientes de flavina (MOF)	REL	$\text{O}_2 + \text{RH} \xrightarrow[\text{NADPH} + \text{H}^+]{\text{P450 / MFO}} \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$
Peroxidasas (Px)	REL, lisosomas	$\text{HO-OH} + \text{H}^+ + \text{NADH} \xrightarrow{\text{Px}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
Carboxilesterasas	REL, citosol, lisosomas	$\text{R-CO-O-R} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CO-OH} + \text{HO-R}$
Alcohol deshidrogenasas (ADH)	Citosol	$\text{HO-CH}_2\text{-R} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{ADH}} \text{H-C(=O)-R} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Aldehído deshidrogenasas (ADLH)	Mitocondria, citosol	$\text{H-C(=O)-R} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{ADLH}} \text{HO-C(=O)-R} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Epóxido hidrolasas	REL, citosol	$\text{R}_2\text{C-O-CR}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R}_2\text{C(OH)-CR}_2(\text{OH})$

<sup>a</sup>REL: Retículo Endoplásmico liso

Citocromos P450 (P450)

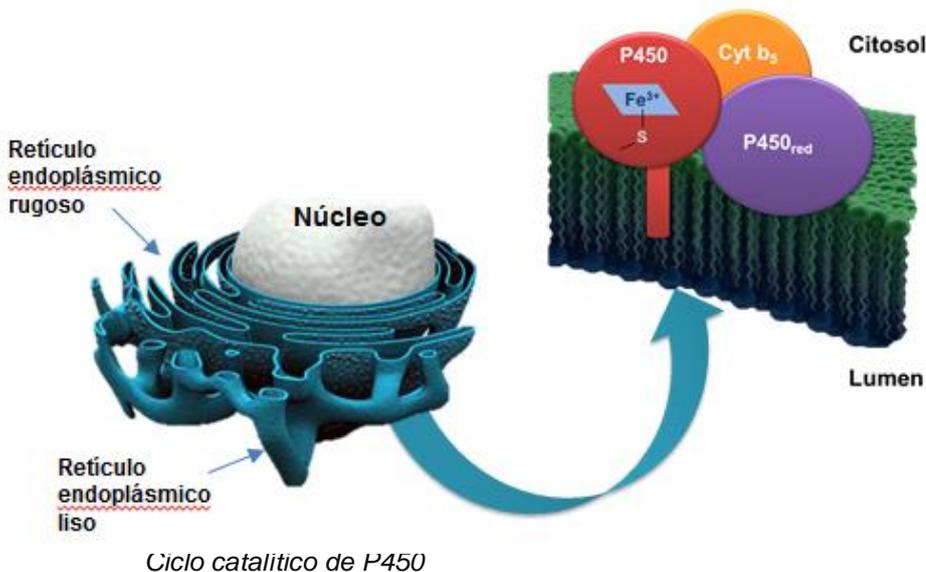
Los P450 son una familia de enzimas que juegan un papel fundamental en el metabolismo de los COV y en general de los xenobióticos. Su importancia radica en que algunas enzimas de P450 pueden llevar a cabo oxidaciones en estructuras químicas muy diversas [94], por ejemplo, compuestos alifáticos, aromáticos, halogenados, etc. (Fig. 1.9). Como prueba de la versatilidad metabólica de P450, se ha estimado que esta familia de enzimas metaboliza cerca del 75% de los fármacos comerciales [95].



**Figura 1.9. Principales reacciones de P450.** Los P450 son considerados como unos biocatalizadores muy versátiles ya que llevan a cabo la mono-oxigenación de compuestos con estructuras químicas muy diversas. En esta figura se ilustran las cinco tipos de oxidación más comunes de P450 [94].

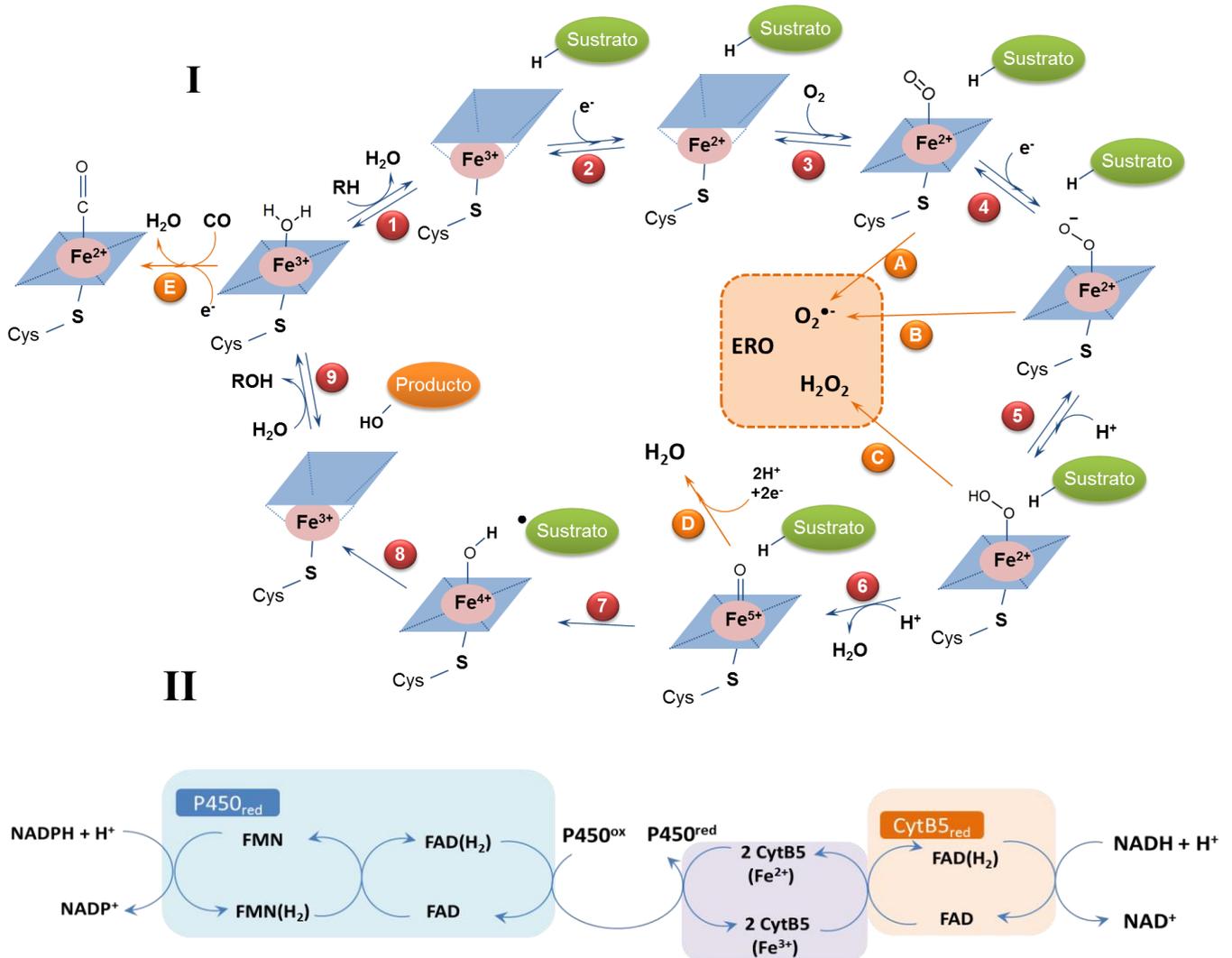
#### Características generales de P450

Cerca del 90% de los P450 se encuentran ubicados en la cara externa del retículo endoplásmico liso de virtualmente todos los tejidos en mamíferos, donde en hígado son particularmente más abundantes [96]. Estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana del retículo a través de una hélice transmembranal del amino *N*-terminal, además se encuentran formando complejos proteínicos con la citocromo P450 reductasa (P450<sub>red</sub>) y con citocromo b<sub>5</sub> (Cytb<sub>5</sub>) (Fig. 1.10) [97][98]. Una característica que tienen en común todas las enzimas de la superfamilia de enzimas de P450 es que poseen un grupo hemo-férrico unido a una cisteína, este grupo prostético es fundamental para llevar a cabo las reacciones redox [99], además este grupo hemo puede formar aductos con monóxido de carbono y formar un complejo de P450 [100](Fig. 1.11



**Figura 1.10. Sistema de P450.** Los P450 forman parte de un sistema que se encarga de la monooxidación de sustancias lipofílicas. Este sistema se encuentra ubicado en la cara externa del retículo endoplásmico liso.

El mecanismo de monooxigenación de los sustratos de P450, no ha sido completamente elucidado, sin embargo los estudios con P450cam (un P450 de *Pseudomonas putida*) han permitido proponer un ciclo catalítico general (Fig. 1.3.10) [94][99][101].



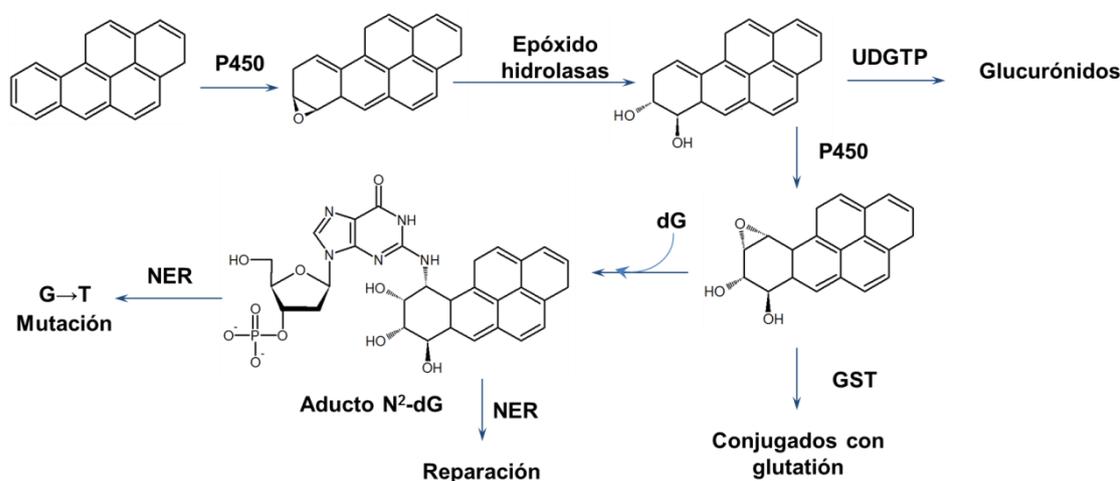
**Figura 1.11. Ciclo catalítico de P450.** El ciclo catalítico de P450 consta de 9 pasos (I): **1)** En estado basal, el hierro del grupo hemo se encuentra en estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y se encuentra en una geometría octaédrica (también conocida como de bajo espín), al entrar el sustrato lipofílico se desplaza una molécula de agua y la geometría del  $\text{Fe}^{3+}$  en el grupo hemo cambia a una geometría de pirámide de base cuadrada (también conocida como de alto espín); **2)** La configuración de alto espín favorece termodinámicamente a la transferencia de un electrón, el cual es transferido a través de la  $\text{P450}_{\text{red}}$  (II); **3)** Una vez que el hierro se encuentra en su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), puede coordinarse con una molécula de oxígeno; **4)** Un segundo electrón es incorporado en P450, este electrón puede provenir de la  $\text{P450}_{\text{red}}$  o del citocromo B5 ( $\text{CytB5}$ ) (II); **5)** y **6)** Un par de iones hidronio participan en la reducción de un átomo de oxígeno en agua, mientras que el otro átomo sigue unido al hierro en un complejo super oxidado de hierro ( $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$ ); **7)** y **8)** El mecanismo de rebote de oxígeno ha sido propuesto para explicar la oxidación del sustrato, en este mecanismo el complejo  $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$  extrae un hidrógeno del sustrato y produce un complejo  $\text{Fe}^{4+}-\text{OH}$ , dejando al sustrato como radical libre, posteriormente este radical libre ataca al complejo de hierro para por fin oxidar al sustrato original; **9)** Una vez que el sustrato es oxidado, sale de la bolsa catalítica y el sitio catalítico de P450 se encuentra listo para un nuevo ciclo.

En esta figura también se muestran las reducciones de oxígeno que no son exitosas, es decir, que no sirven para la oxidación del sustrato (A-D). Adicionalmente se representa el complejo con monóxido de carbono que es responsable del espectro de absorción de la enzima.

Es importante destacar que algunos intermediarios del ciclo de P450 pueden producir especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fig. 1.3.10 A-E), por lo que el incremento en los niveles de P450 o el desacoplamiento de su ciclo (estos dos efectos pueden ser producidos por xenobióticos), pueden incrementar la concentración de las ERO y esto representar un mecanismo secundario de daño producido por xenobióticos [101].

#### Participación de P450 en la bioactivación

Como se mencionó el inicio del capítulo, los metabolitos que resultan de la fase I, usualmente poseen un centro electrofílico que les permite reaccionar con biomoléculas. En algunas ocasiones esta reacción se da con moléculas nucleofílicas muy importantes como el ADN, lo que compromete la viabilidad celular y puede ser el origen de enfermedades como el cáncer [102]. Debido a que los P450 son las enzimas de fase I más importantes, estas enzimas han sido involucradas en numerosos mecanismos de acción de compuestos cancerígenos. En la figura 1.3.11 se muestra como ejemplo el metabolismo del benzo[a]pireno, un cancerígeno muy común producto de combustiones incompletas, por ejemplo en el humo de cigarro [103].



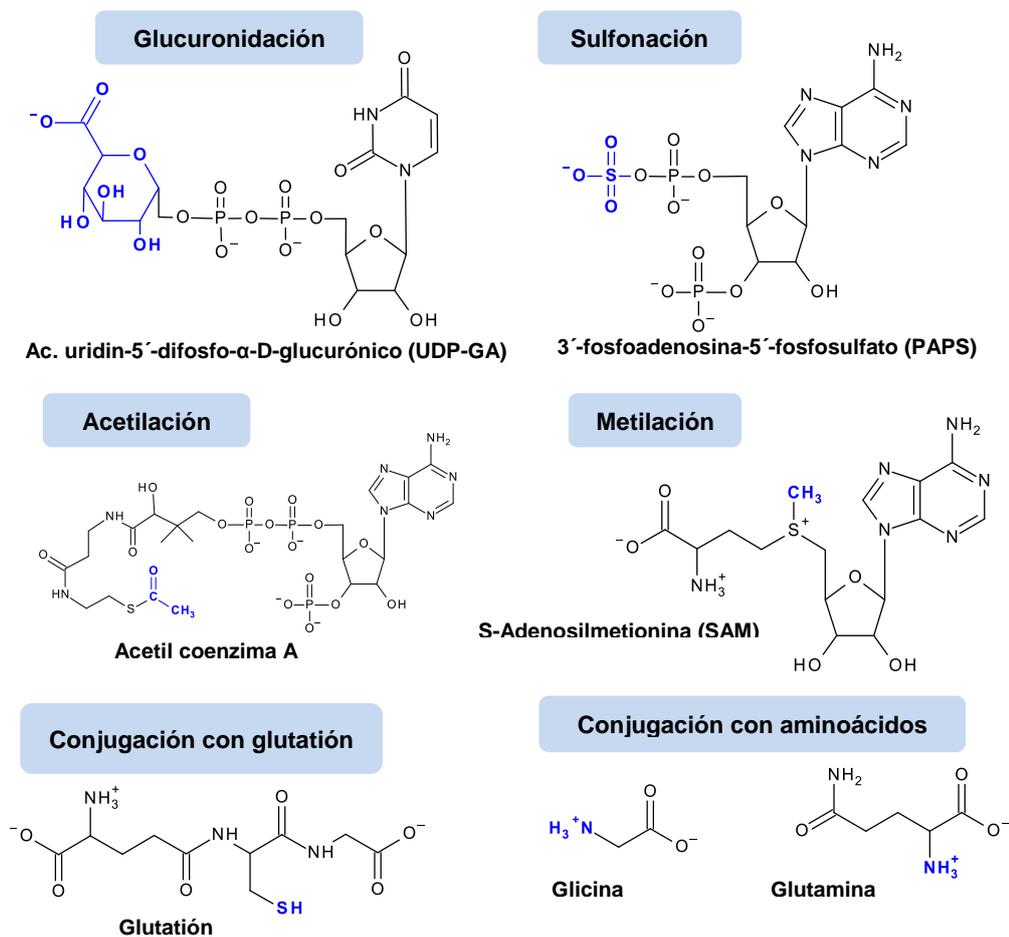
**Figura 1.12. Metabolismo simplificado de benzo(a)pireno.** El benzo(a)pireno es un compuesto aromático policíclico comúnmente encontrado como subproducto de combustiones incompletas. Durante el metabolismo del benzo(a)pireno se forman distintos intermediarios con centros electrofílicos, primero el metabolismo por enzimas de P450 forman un epóxido que puede ser inactivado por las epóxido hidrolasas, formando un diol que puede ser metabolizado por las glucurónido transferasas (UDGTP) y favorecer su desintoxicación. Este diol también puede ser oxidado nuevamente por P450 y generar un nuevo epóxido, el cuál puede ser conjugado con glutatión por las glutatión S-transferasas o puede formar aductos con moléculas nucleofílicas como las bases púricas. Los aductos formados son reconocidos por la maquinaria de reparación por excisión de bases (NER) y en este paso pueden ocurrir dos cosas, que se sustituya la base por una base correcta (reparación) o que se sustituya por una base incorrecta

• **Reacciones de fase II**

Las reacciones de conjugación involucran la adición de una molécula endógena a un xenobiótico, dicha adición se lleva a cabo en un grupo funcional presente en el xenobiótico original o bien en el metabolito resultante de la fase I. En general después de que los xenobióticos son metabolizados por enzimas de la fase II, adquieren una mayor polaridad y por tanto una mayor solubilidad en el agua (con excepción de la metilación y la acetilación), facilitando así su excreción (vía de desintoxicación) [104]. Las reacciones de fase II incluyen glucuronidación, sulfonación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión y conjugación con amino ácidos (Fig.1.13). Las reacciones de fase II se clasifican en dos tipos [76]:

- Tipo 1: Son reacciones que utilizan cofactores de alta energía (UDP-GA, PAPS, Acetil CoA y SAM).
- Tipo 2: En estas reacciones se requiere que el xenobiótico se encuentre activado (con un centro electrofílico), la transferencia de glutatión y de aminoácidos son ejemplos de este tipo de reacciones.

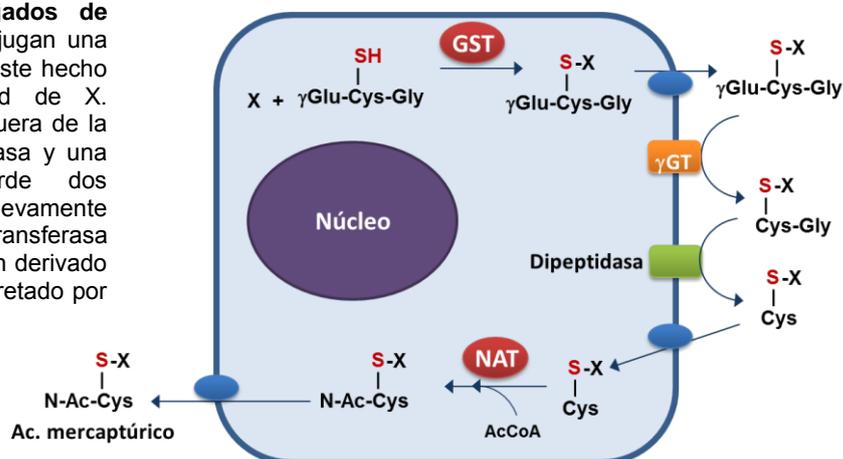
**Figura 1.13. Moléculas implicadas en el metabolismo de fase II.** Las reacciones de glucuronidación, sulfonación, acetilación y metilación utilizan cofactores de alta energía (reacciones Tipo 1), mientras que la conjugación de glutatión y de aminoácidos requiere que el xenobiótico se encuentre activado (reacciones Tipo 2). La porción de las moléculas que se encuentran en azul representan los grupos que son adicionados para el caso de las reacciones tipo 1, mientras que para las reacciones tipo 2, el grupo funcional en azul representa la parte reactiva de la molécula.



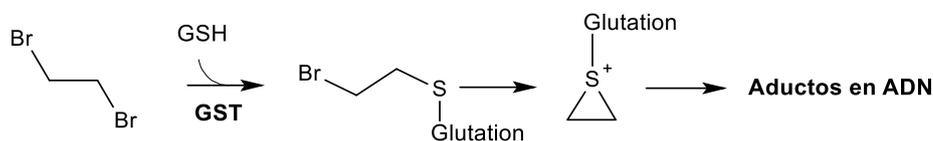
## Glutación transferasas (GST)

Las GST son una súper familia de enzimas que catalizan la transferencia de GSH, dando como resultado la unión covalente del xenobiótico (X) con el grupo tiol de GSH [105]. Los conjugados de glutación son posteriormente metabolizados y excretados como ácido mercaptúrico por vía orina [106](Fig. 1.14).

**Figura 1.14. Metabolismo de los conjugados de glutación.** Las glutación transferasas (GST) conjugan una molécula de glutación con los xenobióticos (X), este hecho incrementa considerablemente la hidrofiliidad de X. Posteriormente, el conjugado es transportado afuera de la célula y metabolizado por la  $\gamma$ -glutamil transferasa y una peptidasa, en estos pasos el conjugado pierde dos aminoácidos. Por último, el metabolito ingresa nuevamente a la célula y es metabolizado por la N-acetil transferasa (NAT), lo que da por resultado la formación de un derivado del ácido mercaptúrico, el cual es finalmente excretado por vía orina.



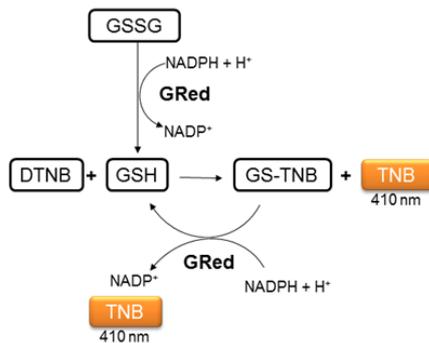
Estas enzimas son especialmente importantes en el metabolismo de los COV, ya que en algunos casos el metabolismo a través de estas enzimas puede llevar a procesos de bioactivación. Un ejemplo de bioactivación de COV por GST es el metabolismo del 1,2-dibromoetano (Fig 1.15) [107].



**Figura 1.15. Bioactivación del 1,2- dibromoetano.** La conjugación del 1,2-dibromoetano con GSH, resulta en la formación del ión episulfonio, el cual es altamente reactivo y puede formar aductos con biomoléculas.

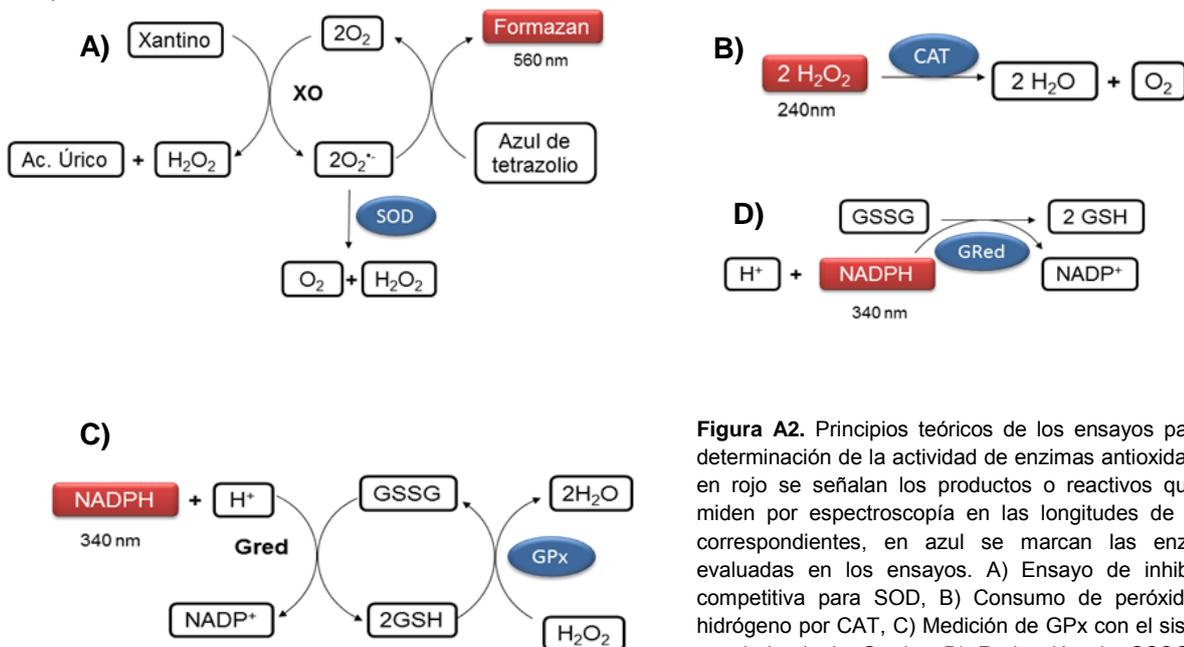
### Anexo 3. Técnicas para la determinación de los biomarcadores propuestos

- Evaluación de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) (Figura A1). Una muestra de hígado (~0.5g) o 1mL de sangre periférica son homogenizados con ácido 5-sulfosalísílico y centrifugados a 15000xg por 3min. Los niveles de GSH/GSSG son cuantificados en el sobrenadante utilizando un ensayo de reciclamiento enzimático descrito por Griffith en 1980.



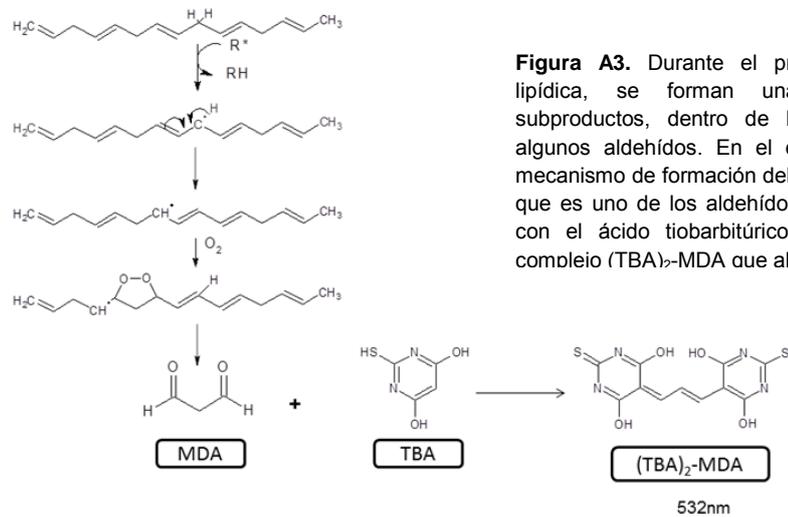
**Figura A1.** Principio del ensayo de reciclamiento enzimático para la cuantificación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). En el ensayo se hace reaccionar el GSH presente en la mezcla con ac. 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), lo cual produce el complejo GS-TNB y ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), este último absorbe a 410nm y es cuantificado por espectroscopía. Para hacer este un ensayo específico, se agrega Gred purificada de levadura, lo que produce GSH y otra molécula de TNB, por lo que al monitorear la formación de TNB a través del tiempo se puede calcular la concentración de glutatión presente en la muestra de interés.

- Actividad hepática de enzimas antioxidantes. Cada ensayo se lleva a cabo utilizando sustratos específicos y en condiciones particulares. La actividad de la Superoxido dismutasa (SOD) se determina con un ensayo de inhibición competitiva utilizando el sistema xantino-xantino oxidasa utilizando como sustrato el azul de tetrazolio (NBT) (Beuchamp Charles and Fridovich Irwin 1971), el ensayo de la Catalasa (CAT) se basa en la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aebi Hugo.1984), la actividad de Glutatión peroxidasa (GPx) se realiza acoplado el sistema de Glutatión reductasa utilizando como sustratos GSH, NADPH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carlberg Inger and Mannervik Bengt. 1985), por último la actividad de la Glutatión reductasa (GRed) se lleva a cabo utilizando como sustratos GSSG y NADPH (Lawrence Richard A. and Burk Raymond.1976).



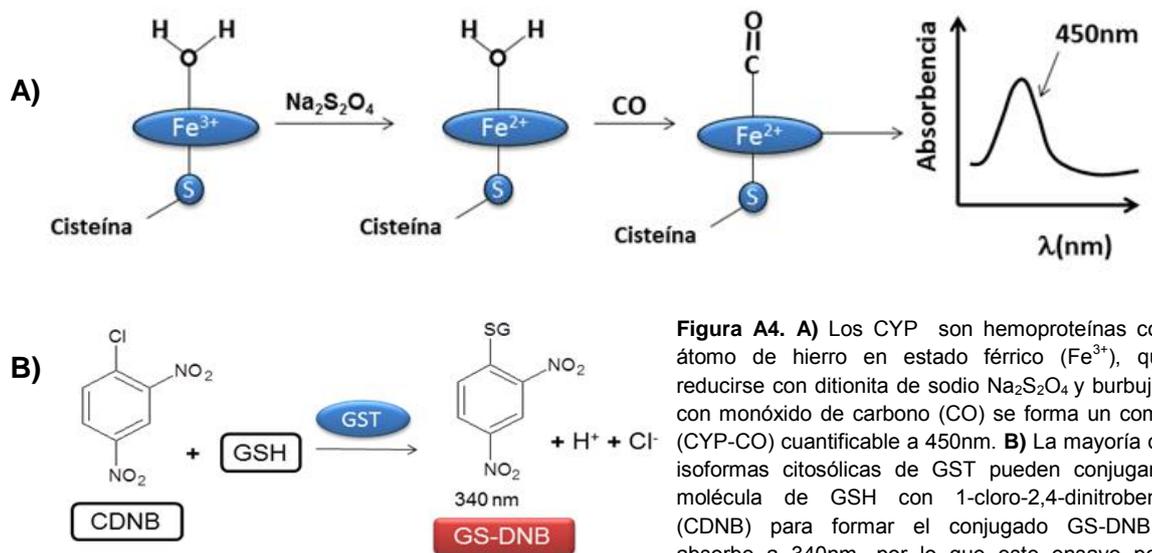
**Figura A2.** Principios teóricos de los ensayos para la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, en rojo se señalan los productos o reactivos que se miden por espectroscopía en las longitudes de onda correspondientes, en azul se marcan las enzimas evaluadas en los ensayos. A) Ensayo de inhibición competitiva para SOD, B) Consumo de peróxido de hidrógeno por CAT, C) Medición de GPx con el sistema acoplado de la Gred y D) Reducción de GSSG por GRed.

- Evaluación de la peroxidación lipídica. Como biomarcador de peroxidación lipídica se utilizará el método descrito por Janero D. en 1989, donde se hace reaccionar al ácido tiobarbitúrico (TBA) con algunos productos de la peroxidación como el malondialdehído (MDA) para formar un complejo colorido que es detectado por espectroscopía a 532nm.



**Figura A3.** Durante el proceso de peroxidación lipídica, se forman una gran cantidad de subproductos, dentro de los que se encuentran algunos aldehídos. En el esquema se muestra el mecanismo de formación del malondialdehído (MDA), que es uno de los aldehídos capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar el complejo (TBA)<sub>2</sub>-MDA que absorbe a 532nm.

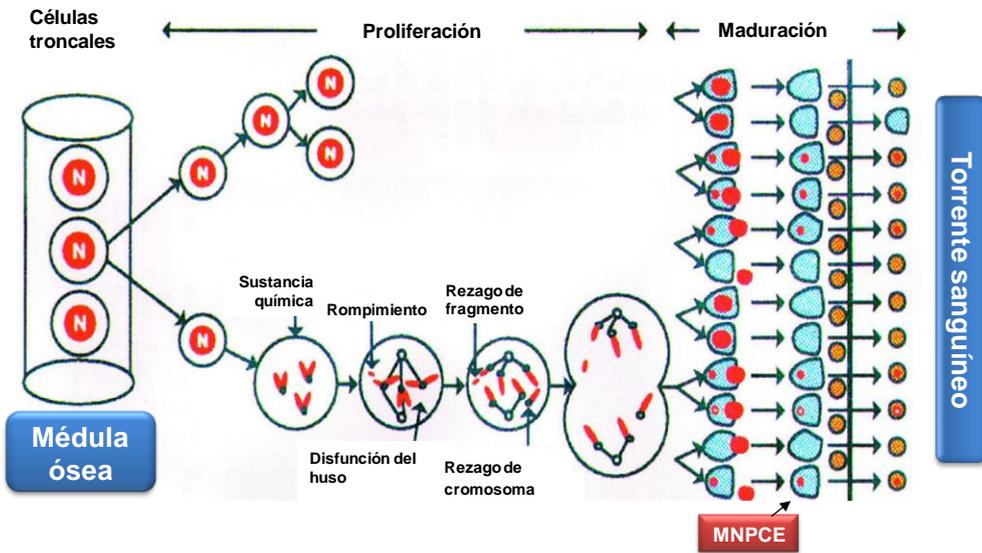
- Metabolismo de Xenobióticos. Los biomarcadores de elección para la caracterización general del metabolismo de xenobióticos son: los niveles de citocromo P450 (CYP) y la actividad de glutatión S- transferasas (GST's). Los CYP serán cuantificados con una técnica de diferencia espectral por el método reportado por Guengerich 2001, donde se hace interactuar las fracciones microsomales hepáticas con monóxido de carbono en presencia de ditionita de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) para formar un complejo CYP-CO que puede ser cuantificado a 450nm. Por otro lado, el ensayo de GSTs se basa en la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu con GSH (Habig *et al.* 1981) (Fig. 8).



**Figura A4. A)** Los CYP son hemoproteínas con un átomo de hierro en estado férrico (Fe<sup>3+</sup>), que al reducirse con ditionita de sodio Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y burbujearse con monóxido de carbono (CO) se forma un complejo (CYP-CO) cuantificable a 450nm. **B)** La mayoría de las isoformas citosólicas de GST pueden conjugar una molécula de GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) para formar el conjugado GS-DNB que absorbe a 340nm, por lo que este ensayo permite determinar la actividad general de GST's.

- Prueba de micronúcleos (MN) en médula ósea. Los MN son corpúsculos que contienen material genético externo al núcleo celular y representan fragmentos cromosómicos o en algunos casos cromosomas enteros que no se incorporan dentro del núcleo durante la mitosis. En la médula ósea se utilizan los eritrocitos policromáticos (PCE) para la evaluación de MN por su alta tasa de proliferación y su facilidad en la evaluación. El mecanismo propuesto para la formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNPCE) se

representa en la figura 9. La médula ósea se obtiene del fémur de los roedores y posteriormente se aíslan los eritrocitos utilizando una columna de celulosa, una vez aislados los eritrocitos se realiza un frotis y las preparaciones se tiñen con los colorantes de Wright y Giemsa (F. Romagna 1989).



**Figura 9.** Cuando una sustancia química reacciona con el DNA, puede inducir el rompimiento de cromosomas o la disfunción del huso acromático, provocando una mala segregación del material genético y dando lugar a la formación del MN. Durante la maduración del eritrocito (eritropoyesis), el núcleo es expulsado de la célula, sin embargo, los eritrocitos dañados mantienen al MN en su citoplasma.

## Research Article

# Micronuclei in Bone Marrow and Liver in relation to Hepatic Metabolism and Antioxidant Response due to Coexposure to Chloroform, Dichloromethane, and Toluene in the Rat Model

Javier Belmont-Díaz,<sup>1,2</sup> Ana Paulina López-Gordillo,<sup>1</sup> Eunice Molina Garduño,<sup>1</sup> Luis Serrano-García,<sup>1</sup> Elvia Coballase-Urrutia,<sup>3</sup> Noemí Cárdenas-Rodríguez,<sup>3</sup> Omar Arellano-Aguilar,<sup>1</sup> and Regina D. Montero-Montoya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México, DF, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Tlalpan, 14080 México, DF, Mexico

<sup>3</sup> Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, 04530 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Regina D. Montero-Montoya; dorinda@unam.mx

Received 28 January 2014; Accepted 24 March 2014; Published 14 May 2014

Academic Editor: Masood Ahmad

Copyright © 2014 Javier Belmont-Díaz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Genotoxicity in cells may occur in different ways, direct interaction, production of electrophilic metabolites, and secondary genotoxicity via oxidative stress. Chloroform, dichloromethane, and toluene are primarily metabolized in liver by CYP2E1, producing reactive electrophilic metabolites, and may also produce oxidative stress via the uncoupled CYP2E1 catalytic cycle. Additionally, GSTT1 also participates in dichloromethane activation. Despite the oxidative metabolism of these compounds and the production of oxidative adducts, their genotoxicity in the bone marrow micronucleus test is unclear. The objective of this work was to analyze whether the oxidative metabolism induced by the coexposure to these compounds would account for increased micronucleus frequency. We used an approach including the analysis of phase I, phase II, and antioxidant enzymes, oxidative stress biomarkers, and micronuclei in bone marrow (MNPCE) and hepatocytes (MNHEP). Rats were administered different doses of an artificial mixture of CLF/DCM/TOL, under two regimes. After one administration MNPCE frequency increased in correlation with induced GSTT1 activity and no oxidative stress occurred. Conversely, after three-day treatments oxidative stress was observed, without genotoxicity. The effects observed indicate that MNPCE by the coexposure to these VOCs could be increased via inducing the activity of metabolism enzymes.

## 1. Introduction

Genotoxic compounds are known to exert their effects on DNA either in a direct way or through their metabolites after going through an enzymatic transformation. Some compounds, however, have been described as being genotoxic via alternative pathways, like the production of ROS.

That is the case of DCM, which is primarily metabolized by CYP2E1 [1] into carbon monoxide which irreversibly binds to hemoglobin. However, under circumstances where CYP2E1 activity is inhibited or saturated it can also be

metabolized into S-chloromethylglutathione by GSTT1 [2] and form DNA adducts [3].

CLF is another compound of this kind, capable of increasing malondialdehyde deoxyguanosine (M1dG) adducts and lipid peroxidation in HepG2 cells [4] via a CYP2E1 mediated oxidation where phosgene and, under anoxic conditions, dichloromethyl are produced [5], both being highly reactive electrophiles, able to form irreversible covalent bonds with biomolecules like lipids, proteins, and reduced glutathione (GSH) and to induce oxidative stress [6, 7].

TOL biotransformation also occurs through CYP2E1 [8], and during its metabolism in rat liver and brain an increased level of reactive oxygen species (ROS) is produced [9]. Its effect on a coexposure with benzene resulted in increased genotoxicity of benzene coupled with reduced glutathione [10].

In spite of the described oxidative metabolism of chloroform, dichloromethane, and toluene, and the formation of oxidative adducts produced by them, their genotoxicity in the micronucleus test, as many studies demonstrate, is not clear (Table 1). We became interested in this subject due to the fact that these three compounds have been detected in rivers polluted with industrial waste affecting animal populations; due to their high volatility these pollutants can be spread through the air and contaminate large areas, constituting a risk of exposure for every living being around. Particularly, these polluted rivers are very close to inhabited areas of agricultural activity [11, 12].

Due to the fact that cytochrome P-450-isoform CYP2E1 (CYP2E1) is mainly responsible for the oxidative metabolism of these VOCs [13, 14] and that this enzyme is known to be capable of inducing reactive oxygen species (ROS) [15, 16] which increase when the enzyme is induced, it appeared possible that under a coexposure to the three compounds clastogenicity could occur that might be detected in the form of micronuclei.

A pilot study was conducted where each compound was administered for three days in doses equivalent to the 10% of the LD50 in rats to analyze whether they would induce oxidative stress and, consequently, micronuclei in bone marrow polychromatic erythrocytes (MNPCE). No genotoxic effects were found with any of the compounds, and CLF and TOL induced CYP2E1 activity. Oxidative stress, measured by the levels of GSH in liver homogenate, was not detected under any treatment (Table 1). These results were used to design a greater study to analyze more parameters on the oxidative response and using different concentrations of the combined compounds. Furthermore, we added the analysis of micronuclei in hepatocytes due to the fact that the metabolism of the three compounds occurs mainly in the liver, irrespective of the route of administration [1, 6, 17] and the more likely target of genotoxicity would be this organ.

Therefore, in the present study a rat model was used to analyze the hepatic xenobiotic metabolism response (P-450 levels, CYP2E1, GST, and GSTT1 activities), the antioxidant response (antioxidant enzymes activity, GSH/GSSG, and TBARS), and whether there would be a relationship of these responses with the genotoxic damage in liver or in bone marrow that could be produced by the coexposure to the three compounds.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Reagents.** HPLC grade chloroform (CAS: 67-66-3), dichloromethane (CAS: 75-09-2), and toluene (CAS: 108-88-3) were purchased from Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA); protein assay dye reagent and

acetylacetone were purchased from Bio-Rad (CA, USA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

**2.2. Maintenance of Animals.** Three-week-old male Wistar rats (89.5 g  $\pm$  14.5) were maintained under controlled temperature 20  $\pm$  2°C and 12 h light/dark cycles for one week prior to the treatment. Animals were fed with a commercial rat chow diet and water *ad libitum*. This study was conducted in compliance with the Mexican Regulations of Good Laboratory Practice (NOM-062-ZOO-1999) and was approved by the ethics committee of our institute.

**2.3. Route of Exposure.** Toluene, chloroform, and methylene chloride, regardless of the route of exposure, are distributed widely throughout the body (toluene in liver and brain) and their metabolism occurs mainly in the liver [1, 6, 17–20]. Furthermore, CLF was found to exhibit similar clastogenic effect in the rat chromosomal aberrations test administered either by oral or i.p. route [21], and TOL exerts its neurological effects when either orally or intraperitoneally administered [17]. By using the i.p. route, we made the toxicants enter the portal circulation and be metabolized in the liver [22], their main organ of metabolism, in order to obtain a maximal response for the production of genotoxicity if there was one. The i.p. route also ensured the internal dose of the three compounds.

**2.4. Pilot Study.** The genotoxic potential, induction of P-450, and reduced glutathione levels for separated treatments with CLF, DCM, or TOL, at i.p. doses of 2.5, 2.6, and 8.1 mmol/kg/day/3 days, respectively (corresponding to 1/10 LD50 of each compound, based on the LD50 reported in the Merck Index), were tested in rats, five animals/compound, in order to approximate the doses that would be used in the mixture.

Due to the wide variability of the environmental levels reported, our protocol was based on LD50 in order to obtain the maximum biological response in the shortest time (according to MNPCE protocols, by Krishna and Hayashi [32]) and to ensure that all components of the mixture would behave with approximately the same toxic potential; for this reason, the doses used are superior to the levels reported in the polluted rivers. However, our doses approximate to other exposure scenarios; for example, toluene is inhaled by some people for its euphoric properties and their exposure approximate 1000–10000 ppm which corresponds to an absorption of 0.2–2 mmol/kg/hr [19]. In relation to occupational exposures, the doses used in the present study are 10 times higher than those recommended by the US-OSHA as permissible exposure limits [18, 20]. On the other side, the doses selected were in the range of those used in other genotoxicity studies in order to make them comparable (Table 1).

**2.5. Coexposure Treatments.** The exposure regime was based on protocols for the rodent micronucleus assay [32, 33] and for the induction of xenobiotic metabolism enzymes [34]. Three groups of rats were used to test the effects of the mixture

TABLE 1: Acute toxic effects in rodent i.p. exposed to dichloromethane (DCM), chloroform (CLF) or toluene (TOL).

VOC	Dose (mmol/kg)	P-450	CYP2E1	Lipid peroxidation	GSH	MNPCE	CA	Reference
DCM	2.5	0	0		0	0		Pilot study
CLF	2.6	0	+0.48		0	0		Pilot study
TOL	8	-0.48	+0.50		0	0		Pilot study
DCM	1.2-2.4	0	0					[23]
	4.8-9.5	+0.4-0.50	+0.35					[23]
	6			0				[24]
	5-20					0		[25]
	1.2-23.5						0	[26]
CLF	0.1				0			[27]
	1.3	0	0		0			[28]
	1.7				-0.07			[27]
	2.0-8.0					0		[25]
	0.01						+3.75	[21]
	0.1-1.0						+7.75	[21]
TOL	5	0	+1.16					[29]
	5.4			0				[9]
	10.8			+0.30				[9]
	16.2			+0.17				[9]
	20				0			[30]
	1.2					0	0	[31]
	2.4					+0.32	0	[31]
	4.7					0	+2.71	[31]

Data represent significant fold increases (+) or decreases (-) with respect to control animals; zero means no change. Cytochrome P450 (P-450), cytochrome 2E1 (CYP2E1), lipid peroxidation and glutathione (GSH) were determined in liver, micronuclei (MNPCE) and chromosomal aberrations (CA) were determined in bone marrow.

of VOCs. Three doses of a mixture of CLF/DCM/TOL (dissolved in corn oil) were intraperitoneally (i.p.) administered to the animals, a single dose for one day or one dose per day over 3 days. The doses to be used were set according to the results in the pilot study, so that the high dose, intermediate dose (mid-dose), and low dose each represent the 10, 5, and 2.5 percent of the LD50 for each compound in the mixture, respectively (Table 2, where the high dose corresponds to the doses used in the pilot study). The control group was given corn oil only.

Additionally, four groups of rats were treated with different chemicals that served as positive controls: trans-Stilbene oxide (tSBO) (2 mmol/kg, i.p., xenobiotic metabolism inducer), carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (9.75 mmol/kg, i.p., oxidative stress damage), benzene (BEN) (12.8 mmol/kg, p.o., BM genotoxic damage), and diethylnitrosamine (DEN) (0.97 mmol/kg, i.p., hepatic genotoxic damage). The number of animals used for each treatment is presented in Table 2.

**2.6. Sample Collection.** The animals were euthanized by cervical dislocation 24 h after the last dose of the corresponding treatment. Livers were freshly excised and washed in cold 0.15 M KCl. Two small pieces (0.25 g approximately) of each liver were obtained to assess micronucleus in hepatocytes

TABLE 2: Doses administered per treatment.

Group of treatment	Doses	N
Neg. control (corn oil)*	125 µL/kg b.w.	5
	TOL/DCM/CLF*	
Low-mix*	2.0/0.6/0.65	5
Mid-mix*	4.0/1.2/1.3	5
High-mix*	8.0/2.5/2.6	5
Positive controls*		
tSBO	2.0	3
CCl <sub>4</sub>	10.0	3
BEN	12.0	3
DEN	1.0	3

\*These were the daily doses administered for one day or three days of the mixture.

\* (mmol/kg b.w.).

BEN and DEN were administered for two days; CCl<sub>4</sub> and tSBO, for three days.

N refers to animals used in either regime of treatment.

(MNHEP), proliferation (mitotic index), and glutathione (GSH/GSSG) levels. The fragment of liver designated for the evaluation of genotoxicity and proliferation was placed in 7 mL of 10% buffered formalin, and the fragment for

quantification of GSH/GSSG was frozen in dry ice. Half of the liver from each animal was homogenized in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, with 0.1% Triton X-100, and centrifuged at 19,000 g for 10 min; the supernatant was used for the determination of the following antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GRed). The remaining liver was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until preparation of microsomal and cytosolic fractions (for no more than 2 weeks). Additionally, both femurs were removed to assess micronucleus in bone marrow polychromatic erythrocytes (MNPCE) and cytotoxicity (%PCE) in bone marrow.

**2.7. Microsomal and Cytosolic Fractions.** Microsomal and cytosolic fractions were prepared according to the procedure described by Guengerich [35] and Dávila-Borja et al. [36].

Protein concentrations in the microsomal and cytosolic fractions were determined using the protein assay dye reagent (Bio-Rad) according to supplier's instructions.

**2.8. P-450 Determination.** The cytochrome P-450 (P-450) content in the hepatic microsomal fraction was determined from the spectrum of the ferrous-carbon monoxide complex, using the molar extinction coefficient of  $91\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  at 450/490 nm [35, 37]. Liver microsomes (0.5–1 mg/mL final concentration) were dissolved in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 1 mM EDTA, 20% glycerol (v/v), and 0.4% Triton X-100. A baseline from 400 to 500 nm was recorded and the sample cell was saturated with carbon monoxide, then both preparations were reduced with a few milligrams of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , and the spectral difference was recorded in the same wavelength range. P-450 content was expressed as nmol/mg protein.

**2.9. CYP2E1 Specific Activity.** CYP2E1 enzyme activity was determined by measuring the hydroxylation of 4-nitrophenol (4-NP) to 4-nitrocatechol (4-NCC) as described by Koop [38]. Briefly, the reaction mixtures contained 0.1 M potassium phosphate buffer and 1 mM ascorbic acid, pH 7, 0.1 mM 4-NP, hepatic microsomes (0.5–1 mg/mL final concentration), and 1 mM NADPH in a final volume of 1 mL. The reactions were initiated with NADPH after preincubation for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and were terminated with 0.2 mL of 1.5 M perchloric acid after 10 min of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ . The precipitated proteins were removed by centrifugation at 4,400 rpm for 5 min and supernatants were mixed with 0.1 mL of 10 N NaOH for the measurement of 4-NCC at 510 nm. The activity was expressed as nmol/min/nmol P-450.

**2.10. GST Activity.** Total GST activity was measured using the method described by Habig and Jakoby [39]. Briefly, the reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.5, 0.05 mM GSH, 0.125 mM DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene), and cytosol (0.03–0.05 mg/mL final concentration) in a final volume of 1 mL. The reactions were initiated with the cytosolic protein addition and the absorbance was recorded for 3 min at 340 nm. Enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient

of the DNCB-GSH conjugate of  $9.6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . The activity was expressed as nmol/min/mg protein.

**2.11. GSTT1 Activity.** The glutathione-S-transferase T1 (GSTT1) hepatic activity was determined following the formation of formaldehyde from DCM [40]. Briefly, the reaction mixture contained 0.1 M TRIS/HCl pH 7.4, 10 mM GSH, cytosol (0.33 mg/mL final concentration), and 8  $\mu\text{L}$  DCM in a final volume of 3 mL. The reactions were initiated with DCM after preincubation for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and were terminated with 0.3 mL of a 50% aqueous trichloroacetic acid solution after 5, 10, and 20 min. The precipitated proteins were removed by centrifugation at 14,000 rpm for 2 min and 0.5 mL of the supernatant was mixed with 0.5 mL of Nash reagent (2 M ammonium acetate, 20 mM acetyl-acetone, and 50 mM acetic acid) and incubated at  $42^{\circ}\text{C}$ . After 30 min the absorption at 412 nm was measured and enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of the DNCB-GSH conjugate of  $8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . The activity was expressed as nmol/min/mg protein.

**2.12. GSH/GSSG Levels.** Frozen liver samples were homogenized in 5 mL of 5-sulfosalicylic acid/g of tissue, using sonication (30 sec, 4.5 intensity,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The homogenates were centrifuged at  $15,000 \times g$  for 3 min at room temperature and the acid supernatants were recovered.

Total glutathione was quantified in the acid supernatants using the enzymatic recycling assay of Anderson [41]. Briefly, the reaction mixture contained 143 mM sodium phosphate and 6.3 mM EDTA pH 7.5, 0.21 mM NADPH, 0.6 mM DTNB (Ellman's reagent), 1  $\mu\text{L}$  of acid supernatant, and 0.5 U of GRed in a final volume of 1 mL. The reactions were initiated with GRed after preincubation for 10 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and absorbance at 412 nm was recorded for 3 min. The reaction rate ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) was converted to nmol of GSH, using a standard curve of known amounts of GSH.

Quantification of oxidized glutathione (GSSG) was performed by derivatization of the reduced glutathione (GSH) present in the sample with 2-vinylpyridine prior to the enzymatic recycling assay, thus preventing GSH from participating in the reaction. Derivatization reaction contained 300  $\mu\text{L}$  of acid supernatants, 6  $\mu\text{L}$  of 2-vinylpyridine, and sufficient triethanolamine to bring the pH in the range of 6–7; reactions were incubated at room temperature for at least 60 min. The enzymatic reaction was in the same conditions as for the quantification of total GSH, except that the volume of the derivatized sample was 50  $\mu\text{L}$ .

The amount of GSH in the sample was calculated by subtracting the amount of GSSG from the amount of total glutathione. The results were expressed in nmol GSH or GSSG/g liver.

**2.13. TBARS.** TBARS were quantified using the method of Janero and Burghardt [42] as a surrogate for the estimation of malondialdehyde (MDA) content. Briefly, 1 g of each liver was homogenized with 500  $\mu\text{L}$  of a solution of 0.1 M butylated hydroxytoluene (dissolved in methanol/phosphate buffer 1:1). The homogenates were centrifuged at 3,000 g for 10 min

and supernatants were recovered. Derivatization reaction contained 200  $\mu\text{L}$  of supernatants and 1 mL of a solution of thiobarbituric acid (26 mM TBA, 0.2 M HCl, 6.66% TCA, and 1 mM deferoxamine mesylate); reaction mixtures were heated in boiling water for 10 min. Reactions were cooled and 1 mL of n-butanol/pyridine (15:1) was added. After centrifugation at 1,200 g for 10 min, supernatants were recovered and their absorbance at 532 nm was recorded. Malondialdehyde (MDA) in whole tissue homogenates was measured using the extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the complex  $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$  and the results were expressed as nmol TBARS/mg protein.

**2.14. CAT Assay.** CAT activity was determined following the enzymatic decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  [43]. Briefly, the reaction mixture contained 10 mM potassium phosphate pH 7.4, 5  $\mu\text{L}$  of homogenate dilution (1:40), and 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a final volume of 725  $\mu\text{L}$ . The reactions were initiated with the addition of the sample and the absorbance at 240 nm was recorded for 30 seg. Under the conditions described, the decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by CAT contained in the samples follows a first-order kinetics as given by the equation  $k = 2.3/\Delta t \log(A_1/A_2)$ , where  $k$  is the first-order reaction rate constant,  $\Delta t(t_2 - t_1)$  is the measured time interval, and  $A_1/A_2$  is the absorbance at  $t_1$  and  $t_2$ , respectively. The results were expressed in k/mg protein.

**2.15. SOD Assay.** SOD activity was measured by a competitive inhibition assay using xanthine-xanthine oxidase system to reduce nitroblue tetrazolium (NBT) [44]. The reaction mixture contained 160  $\mu\text{L}$  of 0.122 mM EDTA, 30.6  $\mu\text{M}$  NBT, 0.122 mM xanthine, 0.006% bovine serum albumin, and 49 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , mixed with 33  $\mu\text{L}$  of liver homogenate (1:50 dilution) and 30  $\mu\text{L}$  of a xanthine oxidase solution to get a final concentration of 2.5 U/L; this mixture was incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with 66  $\mu\text{L}$  of 0.8 mM cupric chloride and the optical density was read at 560 nm. The 100% of NBT reduction was obtained in a tube in which the sample was replaced by distilled water. The amount of protein that inhibited 50% of NBT reduction was defined as one unit of SOD activity. Results were expressed as U/mg protein.

**2.16. GPx Assay.** GPx activity was assayed by a coupled reaction with glutathione reductase (GRed) [45]. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate solution pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 0.2 mM NADPH, 25 U/mL of GRed, and 1 mM GSH at 25°C. 100  $\mu\text{L}$  of liver homogenate diluted 1:10 was added to 800  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture and allowed to incubate for 5 min at room temperature before initiating the reaction by the addition of 32  $\mu\text{L}$  of 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution. Absorbance at 340 nm was recorded for 3 min and the activity was calculated from the slope of these curves as  $\mu\text{moles}$  of NADPH oxidized per min taking into account that the millimolar absorption coefficient for NADPH is  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Blank reactions with homogenates replaced by distilled water were subtracted from each assay. One unit of GPx was defined as the amount

of enzyme that oxidizes 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH/min. The results were expressed as U/mg protein.

**2.17. GRed Assay.** GRed activity was spectrophotometrically assayed using GSSG as substrate and measuring the disappearance of NADPH at 340 nm [46]. The reaction mixture consisted of 0.1 M potassium phosphate and 0.5 mM EDTA, pH 7.6, 1.25 mM NADPH, and 0.5 mM GSSG at 25°C. 25  $\mu\text{L}$  of diluted homogenate (1:5) was added to 475  $\mu\text{L}$  of reaction mixture. Absorbance at 340 nm was recorded for 3 min and the activity was calculated from the slope of the curves as  $\mu\text{moles}$  of NADPH oxidized per min. One unit of GRed was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH/min. The results were expressed as U/mg protein.

**2.18. Bone Marrow Micronucleus Test.** Evaluation of MNPCE was performed according to the procedure of Romagna and Staniforth [47]. BM of a femur was prepared with newborn calf serum (Invitrogen Co.), 25 mM EDTA (3 mL for both femora). Cell suspension was carefully dropped into the center of a cellulose column (Sigma cell type 50 and  $\alpha$ -cellulose) and 25 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS) was added to the column surface. The eluate containing the erythrocytic cells was washed twice in 20 mL of HBSS and centrifuged at 2,200 rpm for 10 min. Finally the pellet was homogenized in the minimum volume of HBSS and the slides were prepared using 3  $\mu\text{L}$  of the pellet.

**2.19. %PCE.** Two smears were made per animal and slides were stained with undiluted Wright-Giemsa (Sigma). A total of 2,000 polychromatic erythrocytes (PCE) from each rat were evaluated for the micronucleus frequency. Additionally, BM cytotoxicity was evaluated by recording the %PCE present in 2,000 erythrocytes per animal.

**2.20. Micronucleus in Hepatocytes (MNHEP).** Formalin-fixed tissue was used according to the method of Parton and Garriott [33] with modifications. Pieces of liver previously fixed in 10% buffered formalin for at least seven days were placed individually into flasks containing 7 mL of 12 N KOH and agitated on a shaker for ~16 hr at room temperature. The liver pieces were carefully placed in a brass cloth (Tyler equivalent 100 mesh size) and rinsed with distilled water. Hepatocytes were dissociated through the cloth using a Teflon pestle and collected in a 50 mL centrifuge tube. The cell suspension was centrifuged at 400 rpm for 10 min, and the water carefully aspirated. The pellet was resuspended in 50 mL distilled water and centrifuged at 400 rpm for 10 min; this step was repeated. After the third centrifugation, the pellet was resuspended in 3 mL of a methanol-acetic acid (3:1) fixative solution and stored at 4°C until slides were prepared.

Two smears were made per animal and slides were stained with undiluted Wright-Giemsa. A total of 2,000 hepatocytes with good morphology from each rat were evaluated for the micronucleus frequency.

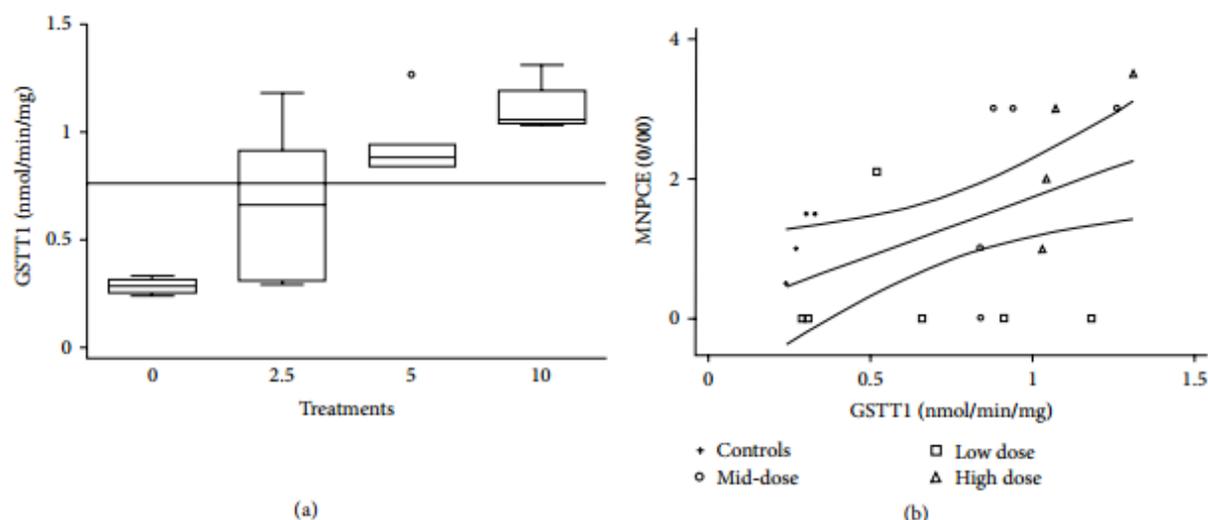


FIGURE 1: One-day treatment. (a) GSTT1 metabolic enzyme showed increased activity with the dose. Boxes represent the first and the third quartile and the median value. The line behind the bars represents the overall mean for this enzyme activity. (b) GSTT1 induced activity correlated with MNPCE,  $R^2 = 0.24$ ,  $P = 0.037$ .

**2.21. Mitotic Index.** In the same slides used for micronucleus determination, one thousand hepatocytes were counted per animal, enumerating the amount of mitotic figures. The mitotic index was calculated as the number of mitosis observed/one thousand cells observed.

**2.22. Statistical Analysis.** All experiments described were done by triplicate and data were captured and analyzed using Stata 7.0 software. Values were expressed as mean  $\pm$  s.d. and group comparisons were assessed using Kruskal-Wallis test. Pearson correlations were explored among data after one-day treatment or three-day treatments, and linear regression was used to analyze the correlations found. Differences between negative and positive controls were calculated by the Student's *t*-test. Significance was established at a level of  $P \leq 0.05$ .

### 3. Results

Effects on the parameters studied were clearly different between one-day and three-day treatments (Table 3).

**3.1. One-Day Treatments.** The simultaneous exposure to the three compounds at different concentrations after one-day treatment resulted in the increased activity of metabolic enzyme GSTT1 with each treatment (Pearson coefficient = 0.76;  $P = 0.0001$ , Table 4 and Figure 1(a)), whereas activity of other GST enzymes was inhibited with the low and high doses (Table 3). CYP2E1 showed increased activity only with the high dose (Pearson coefficient 0.61;  $P = 0.004$ , Table 4), even though the total P-450 hepatic content did not change (Table 3). The antioxidant response, measured through the activity of enzymes SOD, GPx, and GRed, did not show a significant change (Table 3). The ratio of GSH over GSSG was not altered with any dose, and no significant change in TBARS was observed (Table 3).

Micronuclei in PCE showed increased frequencies with the higher doses with a maximal increase of 2.7-fold and a Pearson correlation with the treatments with a coefficient value of 0.57 and  $P = 0.007$  (Tables 3 and 4), whereas %PCE showed no significant change. Interestingly, increased MNPCE were correlated with GSTT1 activity in the liver; Pearson coefficient = 0.49;  $P = 0.04$ . Figure 1(b) shows the linear regression of this result.

Increased MNHEP were observed in the liver related with the dose with a maximal increase of 11-fold which was close to significance (Pearson coefficient = 0.44;  $P = 0.054$ , Tables 3 and 4). However, a reduction of proliferation was observed related with the dose (Pearson coefficient =  $-0.48$ ;  $P = 0.04$ , Table 4).

A summary of the correlations found with this regime of treatment is presented in Table 4.

**3.2. Three-Day Treatments.** Contrary to what was observed in the single-day treatment, three-day treatments with the mixture produced significant responses in the metabolic enzymes at the low dose. Total P-450 were induced in the low dose and then a significant reduction with the dose was observed (Kruskal-Wallis chi value 18.7,  $P = 0.0003$ ), and CYP2E1 activity was significantly increased at low and mid-doses in contrast with the one-day treatment (Kruskal-Wallis chi value 22.2,  $P = 0.0001$ ) (Table 3). GSTs were not altered with this regime of treatment; however, GSTT1, which is involved in the metabolism of DCM, showed a significant 1.75-fold induction in the low dose (Kruskal-Wallis, chi value 13.5,  $P = 0.004$ ), not as high as 2.4-fold as was induced with the same dose with the one-day treatment (Table 3); compared to this regime it would appear that the enzyme was affected in its activity by the treatments for three days.

Antioxidant enzyme GPx showed significantly decreased activity with the low and high dose (Kruskal-Wallis chi value 11.5,  $P = 0.007$ ), GRed showed a significant reduction with

TABLE 3: (a) Result of the one-day treatments. (b) Result of the three-day treatments.

(a)					
Phase I and phase II xenobiotic metabolism					
Treatment	<i>n</i>	[CYP] (nmol/mg)	CYP2E1 (nmol/min/mg)**	GST (mmol/min/mg)	GSTT1 (nmol/min/mg)**
CT	5	0.79 ± 0.11	2.23 ± 0.34	0.47 ± 0.10	0.28 ± 0.04
Low Dose	5	0.76 ± 0.08	1.94 ± 0.24	0.27 ± 0.08	0.67 ± 0.38
Mid Dose	5	0.88 ± 0.13	2.23 ± 0.28	0.44 ± 0.06	0.93 ± 0.19
High Dose	5	0.74 ± 0.13	3.09 ± 0.77	0.34 ± 0.05	1.11 ± 0.13
Antioxidant enzymes					
Treatment	<i>n</i>	SOD†	GPx (U/mg)	Gred (U/mg)	
CT	5	1 ± 0.12	0.18 ± 0.05	0.072 ± 0.006	
Low Dose	5	0.85 ± 0.18	0.14 ± 0.01	0.068 ± 0.007	
Mid Dose	5	0.96 ± 0.21	0.18 ± 0.02	0.073 ± 0.011	
High Dose	5	0.91 ± 0.14	0.18 ± 0.03	0.073 ± 0.001	
Oxidative stress					
Treatment	<i>n</i>	[GSH] (mmol/g)	[GSSG] (mmol/g)	[GSH]/[GSSG]	TBARS (nmol/mg)
CT	5	2.97 ± 0.95	0.10 ± 0.05	27.49 ± 8.53	0.18 ± 0.05
Low Dose	5	4.34 ± 0.92	0.13 ± 0.03	35.06 ± 10.70	0.28 ± 0.10
Mid Dose	5	2.44 ± 0.8	0.10 ± 0.07	33.02 ± 15.71	0.21 ± 0.05
High Dose	5	3.05 ± 1.13	0.10 ± 0.06	28.61 ± 21.14	0.17 ± 0.03
Genotoxicity and proliferation					
Treatment	<i>n</i>	MNPCE (%)**	%PCE	MNHEP/1000	Metaphase (%)
CT	5	1.20 ± 0.44	42.55 ± 8.43	0.1 ± 0.17	5.63 ± 3.70
Low Dose	5	0.00 ± 0.00	31.08 ± 12.28	0.30 ± 0.44	3.90 ± 3.27
Mid Dose	5	2.00 ± 1.41	43.64 ± 17.62	0.40 ± 0.65	2.00 ± 2.18
High Dose	5	3.20 ± 2.07	43.45 ± 7.87	0.70 ± 1.10	2.20 ± 1.10
Ben/DEN	3	10.75 ± 4.21*	49.76 ± 5.30	1.33 ± 1.41*	9.75 ± 3.10
(b)					
Phase I and phase II xenobiotic metabolism					
Treatment	<i>n</i>	CYP (nmol/mg)**	CYP2E1 (nmol/min/mg)**	GST (mmol/min/mg)	GSTT1 (nmol/min/mg)**
CT	5	0.54 ± 0.11	1.06 ± 0.29	0.47 ± 0.06	0.33 ± 0.10
Low Dose	5	0.72 ± 0.09	1.64 ± 0.22	0.46 ± 0.08	0.58 ± 0.13
Mid Dose	5	0.60 ± 0.10	1.96 ± 0.32	0.51 ± 0.07	0.38 ± 0.16
High Dose	5	0.41 ± 0.08	1.06 ± 0.21	0.50 ± 0.07	0.34 ± 0.11
tSBO	3	0.85 ± 0.07*	2.36 ± 0.14	0.53 ± 0.06	0.74 ± 0.18*
Antioxidant enzymes					
Treatment	<i>n</i>	SOD***	GPx (U/mg)**	Gred (U/mg)**	CAT (k/mg)
CT	5	1.11 ± 0.07	0.13 ± 0.01	0.05 ± 0.014	0.51 ± 0.12
Low Dose	5	0.96 ± 0.11	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.010	0.50 ± 0.15
Mid Dose	5	0.89 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.03 ± 0.007	0.42 ± 0.05
High Dose	5	0.83 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.012	0.39 ± 0.06
CCl <sub>4</sub>	3	0.71 ± 0.06*	0.08 ± 0.02*	0.02 ± 0.005*	0.3 ± 0.13*
Oxidative stress					
Treatment	<i>n</i>	[GSH] (mmol/g)**	[GSSG] (mmol/g)**	[GSH]/[GSSG]**	TBARS (nmol/mg)**
CT	5	6.79 ± 4.02	0.15 ± 0.07	47.30 ± 15.08	0.15 ± 0.04
Low Dose	5	15.57 ± 1.63	0.18 ± 0.08	95.21 ± 33.83	0.19 ± 0.01
Mid Dose	5	7.63 ± 0.64	0.13 ± 0.03	60.91 ± 11.21	0.27 ± 0.005
High Dose	5	7.02 ± 1.15	0.53 ± 0.36	16.05 ± 5.42	0.27 ± 0.02
CCl <sub>4</sub>	3	10.38 ± 3.6	0.52 ± 0.24*	20.53 ± 2.95*	0.19 ± 0.02*

(b) Continued.

Treatment	n	MNPCE (%)	Genotoxicity and proliferation		
			%PCE**	MNHEP/1000	Metaphase (%)**
CT	5	1.88 ± 1.27	53.58 ± 5.80	0.1 ± 0.17	2.30 ± 2.52
Low Dose	5	1.13 ± 0.64	40.23 ± 12.87	0.19 ± 0.25	2.13 ± 1.25
Mid Dose	5	0.75 ± 1.07	52.91 ± 2.80	0.06 ± 0.17	2.1 ± 2.7
High Dose	5	0.56 ± 0.50	43.75 ± 11.84	0.31 ± 0.45	0.25 ± 0.46
Ben/DEN	3	5.38 ± 3.12*	56.61 ± 2.39	1.33 ± 1.41*	9.75 ± 3.10*

Mean values plus standard deviations are presented for all the parameters.

\*Positive controls significantly different from negative controls (Student *t*-test).

\*\*Parameters where a difference due to the treatment was found at least in one dose. Kruskal-Wallis rank test,  $P \leq 0.05$ . See text for details.

†Relative units.

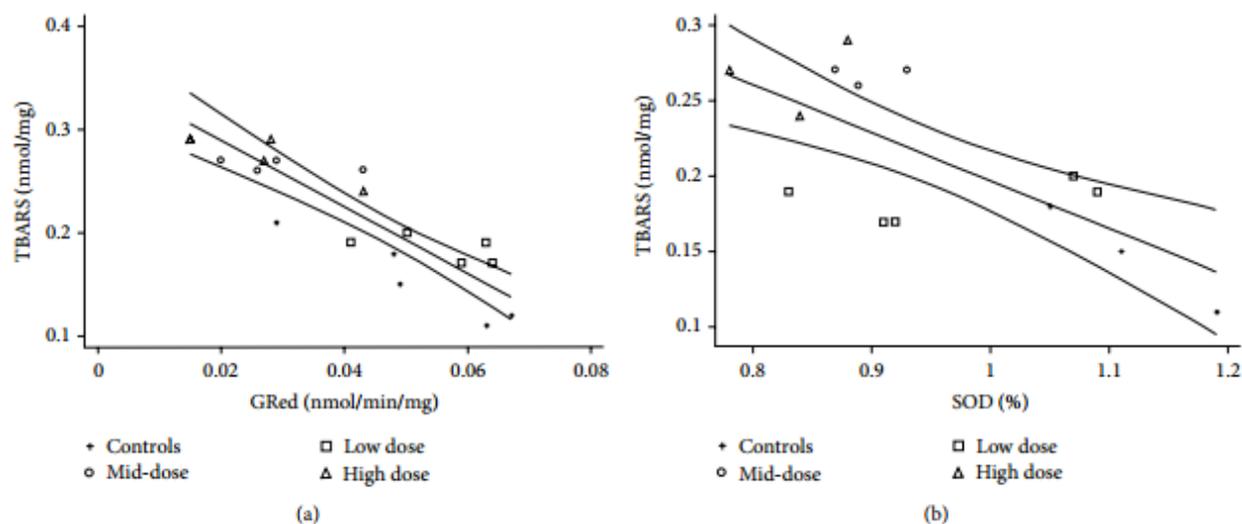


FIGURE 2: Three-day treatment. TBARS were increased in a dose-related manner, probably as the result of the reduced activity of antioxidant enzymes like GRed which showed an inverse correlation with it (a),  $R^2 = 0.76$ ,  $P = 0.00001$ , and SOD which also showed an inverse correlation (b),  $R^2 = 0.52$ ,  $P = 0.004$ .

TABLE 4: Correlations found between parameters after one-day treatments.

	Treatments	GSTT1 (nmol/min/mg)	TBARS (nmol/mg)
GSTT1 (nmol/min/mg)	0.76		
	<b>0.0002</b>		
MNPCE (%)	0.57	0.49	
	<b>0.007</b>	<b>0.04</b>	
MNHEP (%)	0.44		
	<b>0.054*</b>		
CYP2E1 (nmol/min/mg)	0.61	0.48	-0.48
	<b>0.004</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>

Pearson coefficients.

*P* values are in bold.

\*Close to significance.

the dose (Pearson coefficient =  $-0.61$ ;  $P = 0.01$ ), and SOD also exhibited a decreased activity related with the treatments (Pearson coefficient =  $-0.75$ ;  $P = 0.002$ ), while CAT showed nonsignificant reductions with treatments. These findings were consistent with the significant reduction of

the GSH/GSSG ratio at the high dose (Pearson coefficient =  $-0.51$ ;  $P = 0.002$ , Table 5) and it was correlated with the induced activity of metabolic enzymes CYP2E1 and GSTT1 with identical Pearson coefficient = 0.55, and  $P = 0.003$ . Oxidative stress was observed under this regime, producing increased levels of TBARS with each dose (Pearson coefficient = 0.82;  $P = 0.00001$ , Table 3) which significantly correlated with GRed activity (Pearson coefficient =  $-0.87$ ;  $P = 0.00001$ ) and SOD activity (Pearson coefficient =  $-0.72$ ;  $P = 0.004$ ); Figure 2 shows the linear regressions. A summary of the correlations found with this regime of treatment is presented in Table 5.

The oxidative stress was not reflected in micronucleus production in the BM, whereas in the liver MNHEP were increased in the high dose (3-fold), although at a lower level than with the one-day treatment. A greater variability in %PCE was observed in the BM with significant reductions at the low and high doses (Kruskal-Wallis, chi value 8.6,  $P = 0.03$ , Table 3), whereas in the liver, the proliferation was generally lower than with the one-day treatment and the highest dose produced a significant cytotoxic effect (Kruskal-Wallis, chi value 8.2,  $P = 0.03$ , Table 3).

TABLE 5: Correlations found between parameters after three-day treatments.

	Treatments	TBARS (nmol/mg)	GSTT1 (nmol/min/mg)	CYP2E1 (nmol/min/mg)	P-450 (nmol/mg)	CAT (k/mg)
GRed (U/mg)	-0.61 <b>0.01</b>	-0.87 <b>0.00001</b>				
P-450 (nmol/mg)	-0.48 <b>0.01</b>			0.62 <b>0.0004</b>		
GSH/GSSG (ratio)	-0.51 <b>0.002</b>		0.55 <b>0.003</b>	0.55 <b>0.003</b>	0.68 <b>0.00001</b>	
TBARS (nmol/mg)	0.82 <b>0.00001</b>					
SOD	-0.75 <b>0.002</b>	-0.72 <b>0.004</b>				0.56 <b>0.04</b>
GSTT1 (nmol/min/mg)				0.38 <b>0.03</b>		
GPx (activity)			-0.55 <b>0.02</b>			

Pearson coefficients.  
P values are in bold.

#### 4. Discussion

In order to gain insight into the relationship of metabolism, oxidative stress, and micronucleus production related with the coexposure to CLF, TOL, and DCM, our study considered two different regimes of exposure in a rat model: a single-day treatment and a three-day treatment (one dose/day). The two regimes produced a different pattern of response (Table 3) in all the parameters.

**4.1. One-Day Treatments.** No change in the antioxidant response was observed under the single-day treatment and oxidative stress biomarkers such as TBARS and the GSH/GSSG ratio were not altered. Phase I and phase II enzymatic activity, in turn, exhibited induction; that is, CYP2E1 and GSTT1 activities were induced (Table 3). CYP2E1 is involved in the biotransformation of the three compounds tested, whereas GSTT1 participates in the bioactivation of DCM, producing a metabolite suspected to be the precursor of formaldehyde, a known genotoxic carcinogen [1] (Figure 3). GSTT1 in this instance would not be acting as a phase II conjugating enzyme but more as an activating enzyme as has been described in the metabolism of DCM.

MNPCE showed an increase related with the dose and interestingly, they were correlated with GSTT1 activity. This was the only parameter measured in the liver that showed a correlation with BM MNPCE, which could be explained in two possible ways: (1) The exposure to the mixture of pollutants could induce GSTT1 activity in the erythroid line, this process could increase bioactivation of DCM on the bone marrow, leading to genotoxicity [30, 48, 49], or (2) The bioactivation of DCM in liver produces a reactive metabolite that is transported by the bloodstream into the bone marrow, causing the genotoxic damage. It is known that the modulation of GSTT1 activity directly affects the metabolism of DCM, so that if there is an increase in the GSTT1 activity the DCM metabolism is higher and vice

versa [50, 51]; therefore it is reasonable to think that the relation between GSTT1 and MNPCE could be linked to the metabolism of DCM.

**4.2. Three-Day Treatments.** The three-day regime exerted a more intensive oxidative effect than the single-day treatment, reducing the activity of the antioxidant enzyme GPx (which reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water), inducing CYP2E1 (whose activity generates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide anion), and producing damage to lipids (TBARS) in all doses, which was inversely correlated with GRed (which has the function of recovering GSH from GSSG and making it available to protect the cell from oxidation) and SOD (which conjugates superoxide anion) activities. The ratio GSH/GSSG was first induced and then decreased with increasing doses in a similar manner as CYP2E1; these two parameters showed a significant correlation and a similar correlation was found with induced GSTT1 (Table 5).

Previous studies showed little evidence of oxidative stress produced by the individual compounds when administered *in vivo* at doses even higher than the ones used in the present study [9, 24, 27, 28, 52] (Table 1) and we did not find changes in GSH levels with any of the individual compounds administered at the high dose for three days in the pilot study either (Table 1).

Our results are comparable to those obtained by Bird et al. [10] with benzene and TOL where MNPCE produced by benzene were increased in a coexposure to TOL, but they decreased upon GSH depletion; in the single-day treatment we observed increased MNPCE but not so after three-day exposure where GSH/GSSG ratio was significantly reduced, correlating with a lower activity of CYP2E1 and GSTT1 (Table 5). This might have to do with a reduced formation of toxic metabolites, like S-chloromethylglutathione (which is suspected of producing sister chromatid exchanges [53]), and for that reason no significant MN induction was observed (Figure 3).

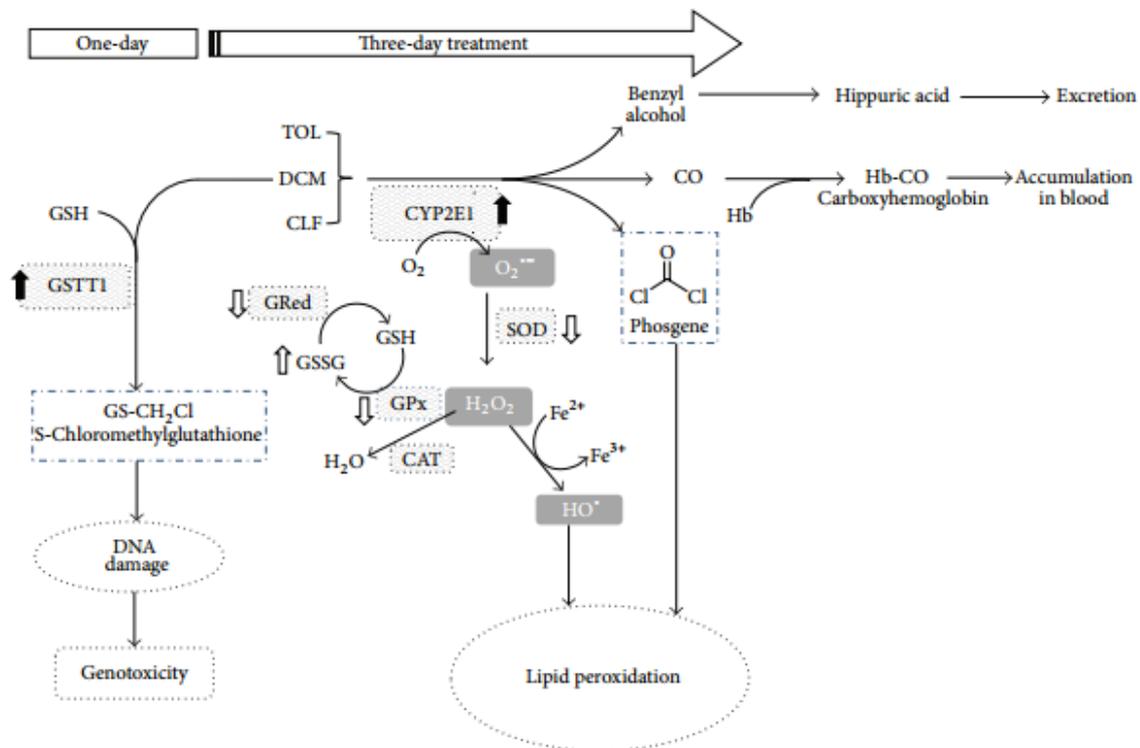


FIGURE 3: Diagram representing how the combined metabolism of the three compounds could induce the responses observed. After one-day treatments, GSTT1 and CYP2E1 induction could contribute to the generation of metabolites and ROS to produce increased MNPCE. After three-day treatments, still induced CYP2E1 and reduced activity of antioxidant enzymes (empty arrows) lead to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the superoxide anion, damaging membranes and allowing an oxidative stress.

P-450 levels under the three-day treatment were significantly induced in the low dose, but then they decreased with the dose, being significantly reduced only in the high-dose treatment (Table 3).

CYP2E1 activity, in turn, was significantly increased at the low and mid-doses. When individually administered in the pilot study, CLF and TOL also produced an induction (Table 1). Similar induction was found by González-Jasso et al. [29] with TOL alone in 5 mmol/kg doses and by Pathiratne et al. [52] with a higher dose (20 mmol/kg) of TOL (Table 1). CYP2E1 is the P-450 isoform involved in these VOCs metabolism and its increased activity was expected. Induction of this enzyme is part of a mechanism of adaptive response to chemicals and its deregulation may have important toxicological consequences; for example, the induction of CYP2E1 has been associated with an increment of ROS production in the liver and this process is thought to contribute to alcohol-dependent liver injury [54], as well as the induction of CYP2E1 by solvents, prior to the exposure to DCM, increased blood carboxyhemoglobin levels in rats [55, 56] due to CO produced in the metabolism of DCM. Metabolism by CYP2E1 has also been described in the toxic pathway of chloroform [57] to produce phosgene adducts in the amino terminus of human histone H2B [58], probably mimicking the acetylation of the histone with consequences

for gene expression. Figure 3 represents how the results found could be explained based on what is known about the metabolism of these compounds.

In relation with the type of interaction of the three compounds, it depends on the doses used and on the biomarkers taken as a reference. Based on previous studies (Table 1), we can say that the response by the xenobiotic metabolizing enzymes was similar to the response obtained in exposures to individual compounds after three days; however, in relation to the oxidative response, the mixture produced an oxidative stress that was never observed with individual compounds at the same doses; hence, the coexposure resulted in synergistic effects affecting the antioxidant response of the organism.

**4.3. Oxidative Stress and Micronuclei.** Given that an oxidative stress was induced with the treatments, an increase in MN was expected either in the BM or in the liver. Individual compounds had been analyzed for their genotoxicity and the results were inconsistent, indicating some clastogenic activity for the three compounds but not in every test [25, 26, 31, 53, 59] (Table 1). In our pilot study no significant genotoxic effect with any of the individual compounds in the bone marrow was found with a three-day treatment either (Table 1). With the coexposure after three days, MNHEP did not increase, at the same time that the mitotic index was significantly reduced

with the high treatment (9-fold). In visual inspections of the liver of animals who received three treatments with the high dose, fatty scars were observed. Increased MN with respect to the one-day treatment was expected in the BM as well, but it was not found and a trend at reduced %PCE was found, being significant at the low and high doses (Kruskal-Wallis test,  $P = 0.04$ ). %PCE in the BM can be used to indicate BM toxicity; when replacement of existing PCEs from the erythroblast pool is depressed, the %PCE will decrease [60].

**4.4. MNHEP.** Micronuclei in hepatocytes had not been reported before for these compounds. They are weakly genotoxic to the BM and according to our results their genotoxicity in a coexposure would depend on the induction of metabolic enzymes like GSTT1 and hence to the production of genotoxic metabolites. The observed effect on hepatocytes was 5- to 11-fold higher than in controls after only one-day treatment; however, proliferation in the liver was reduced at the same time. Hepatic proliferation is considerably lower than in the BM and the proliferation of cells is necessary for the formation of MN, and even though young rats were used and an increase with the dose was found (Table 4), only 46% of the animals treated with any dose of the mixture showed MNHEP; an interesting finding was that, among these animals who showed an increase, it was significantly correlated with CYP2E1 induced activity ( $P < 0.04$ , data not shown) in a similar effect as that of the metabolic polymorphisms in humans. Conversely 75% of the animals were responsive to DEN, the positive control; it did not affect the proportion of evaluable cells and even induced proliferation (Table 3). On the other hand, three days of treatment were too oxidative, but no increase in genotoxicity was observed.

**4.5. Differences between One-Day and Three-Day Treatments.** The toxic effects of xenobiotics depend on the dose and on the time of exposure. In the present study, three doses of the mixture under two types of xenobiotic exposure regimen (single and repeated doses) were tested. This type of experimental design was useful for understanding the toxicological behavior of the mixture of VOCs in different scenarios. The single exposure regime was used to evaluate the first responses of the organism when exposed to a mixture of VOCs, while the regimen of repeated doses was used to assess the accumulation of damage.

The single dose protocol revealed that the biomarkers of oxidative stress and cytotoxicity were maintained at normal levels, whereas the biomarkers of xenobiotic metabolism and genotoxicity increased with the dose. These results can be interpreted as follows: with a single dose, defense systems are not exceeded and are able to maintain cell homeostasis; however the organism is able to sense the presence of xenobiotics and activates the metabolism to accelerate detoxification; the increase in metabolism also increases the levels of reactive metabolites and biomolecular damage (micronuclei) is more probable.

With the repeated dose protocol, biomarkers of oxidative stress, membrane damage, cytotoxicity, and xenobiotic

metabolism were increased with the dose, whereas genotoxicity was decreased. This result indicates that damage to macromolecules accumulated and the defense system was completely exceeded, leading to cell injury or death. Since the formation of micronuclei depends on cell proliferation, cell arrest or cytotoxicity would explain the decrease in micronuclei frequency. These results are in contrast to what was found with individual compounds in the pilot study which did not induce genotoxicity, cytotoxicity, or oxidative stress; however, in a coexposure like this, the outcome was synergistic and even overpassed the antioxidant defense of the organism causing visible liver damage comparable to what has been described about alcohol-dependent liver injury [54].

In summary, the use of two exposure regimes allowed us to propose scenarios where the cellular response is sufficient to maintain the viability even if sustaining a genotoxic effect that could translate in subtle alterations on the long term, or when the response is completely exceeded, compromising cellular integrity that could lead to tissue illness in a short period of time.

## 5. Conclusions

The coexposure to CLF, DCM, and TOL induced the activity of metabolism enzyme GSTT1 and it was correlated with the micronucleus frequency in the bone marrow, after only one treatment. Even though the micronuclei induction was not as high as it is with benzene or other well-established clastogenic agents, these lesions could be of relevance in a prolonged exposure regime or in a combined exposure with a clastogenic agent which is possible in a polluted environment scenario. At the same time ROS could have been produced by the induced activity of CYP2E1, generating genotoxicity, but in levels not affecting the activity of antioxidant enzymes or GSH levels, opening the possibility that a lower and sustained exposure over time could produce significant chromosomal damage in both tissues. Future experiments would help dilucidate this matter.

Sustained exposure for three days under this regime led to oxidative stress at all doses without affecting the survival of the animals but producing fat liver.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Acknowledgments

The authors express their gratitude to Pedro Medina for his technical assistance in the preparation and staining of hepatocytes and to Bernardino Huerta for his technical assistance in the determination of TBARS and antioxidant enzymes. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Grant no. [51242]; Javier Belmont was a Ph.D. student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a scholarship [176503] from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

## References

- [1] P. M. J. Bos, M. J. Zeilmaker, and J. C. H. van Eijkeren, "Application of physiologically based pharmacokinetic modeling in setting acute exposure guideline levels for methylene chloride," *Toxicological Sciences*, vol. 91, no. 2, pp. 576–585, 2006.
- [2] J. D. Hayes, J. U. Flanagan, and I. R. Jowsey, "Glutathione transferases," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, pp. 51–88, 2005.
- [3] K. Watanabe, R. G. Liberman, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, and F. P. Guengerich, "Analysis of DNA adducts formed in vivo in rats and mice from 1,2-dibromoethane, 1,2-dichloroethane, dibromomethane, and dichloromethane using HPLC/accelerator mass spectrometry and relevance to risk estimates," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 20, no. 11, pp. 1594–1600, 2007.
- [4] E. J. Beddowes, S. P. Faux, and J. K. Chipman, "Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress," *Toxicology*, vol. 187, no. 2-3, pp. 101–115, 2003.
- [5] D. Mansuy, P. Beaune, T. Cresteil, M. Lange, and J. P. Leroux, "Evidence for phosgene formation during liver microsomal oxidation of chloroform," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 79, no. 2, pp. 513–517, 1977.
- [6] A. F. Sasso, P. M. Schlosser, G. L. Kedderis et al., "Application of an updated physiologically based pharmacokinetic model for chloroform to evaluate CYP2E1-mediated renal toxicity in rats and mice," *Toxicological Sciences*, vol. 131, no. 2, pp. 360–374, 2013.
- [7] S. Gemma, L. Vittozzi, and E. Testai, "Metabolism of chloroform in the human liver and identification of the competent P450s," *Drug Metabolism & Disposition*, vol. 31, no. 3, pp. 266–274, 2003.
- [8] T. Nakajima, R.-S. Wang, E. Elovaara et al., "Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450," *Biochemical Pharmacology*, vol. 53, no. 3, pp. 271–277, 1997.
- [9] C. J. Mattia, S. F. Ali, and S. C. Bondy, "Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs," *Molecular and Chemical Neuropathology*, vol. 18, no. 3, pp. 313–328, 1993.
- [10] M. G. Bird, B. A. Wetmore, D. J. Letinski et al., "Influence of toluene co-exposure on the metabolism and genotoxicity of benzene in mice using continuous and intermittent exposures," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 184, no. 1-2, pp. 233–239, 2010.
- [11] CONAGUA, "Evaluación del riesgo sanitario ambiental de las zonas aledañas al Río Atoyac," Resumen ejecutivo, 2008.
- [12] R. Montero, L. Serrano, A. Araujo et al., "Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes," *Mutagenesis*, vol. 21, no. 5, pp. 335–342, 2006.
- [13] F. P. Guengerich, D.-H. Kim, and M. Iwasaki, "Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 4, no. 2, pp. 168–179, 1991.
- [14] W. Tassaneeyakul, D. J. Birkett, J. W. Edwards et al., "Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m- and p-xylene," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 276, no. 1, pp. 101–108, 1996.
- [15] A. Y. Sun, M. Ingelman-Sundberg, E. Neve et al., "Ethanol and oxidative stress," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 25, supplement 1, pp. 237S–243S, 2001.
- [16] M. Ingelman-Sundberg and I. Johansson, "Mechanisms of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and other forms of rabbit liver microsomal cytochromes P-450," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 10, pp. 6447–6458, 1984.
- [17] K. L. Shelton and G. Slavova-Hernandez, "Characterization of an inhaled toluene drug discrimination in mice: effect of exposure conditions and route of administration," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 92, no. 4, pp. 614–620, 2009.
- [18] EPA USA, "Ambient Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Chloroform Revised Draft," EPA-822-R-04-002, 2003.
- [19] EPA USA, "Toxicological Review of Toluene," EPA/635/R-05/004, 2005.
- [20] EPA USA, "Toxicological Review of Dichloromethane," EPA/635/R-10/003E, 2011.
- [21] K. Fujie, T. Aoki, and M. Wada, "Acute and subacute cytogenetic effects of the trihalomethanes on rat bone marrow cells in vivo," *Mutation Research*, vol. 242, no. 2, pp. 111–119, 1990.
- [22] K. K. Rozman and C. D. Klaassen, "Absorption, distribution, and excretion of toxicants," in *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology*, C. D. Klaassen and J. B. Watkins III, Eds., pp. 59–70, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 2003.
- [23] M. Paolini, R. Mesirca, L. Pozzetti, G. L. Biagi, and G. Cantelli-Forti, "Selective induction of murine liver cytochrome P450 IIB1 by halogenated hydrocarbons," *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 36, no. 3-4, pp. 235–249, 1992.
- [24] Y. C. Kim, "Dichloromethane potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats," *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 35, no. 1, pp. 138–141, 1997.
- [25] E. Gocke, M.-T. King, K. Eckhardt, and D. Wild, "Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European Communities," *Mutation Research*, vol. 90, no. 2, pp. 91–109, 1981.
- [26] B. Westbrook-Collins, J. W. Allen, Y. Sharief, and J. Campbell, "Further evidence that dichloromethane does not induce chromosome damage," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 10, no. 2, pp. 79–81, 1990.
- [27] P.-Y. Wang, T. Kaneko, H. Tsukada, M. Nakano, and A. Sato, "Dose- and route-dependent alterations in metabolism and toxicity of chemical compounds in ethanol-treated rats: difference between highly (chloroform) and poorly (carbon tetrachloride) metabolized hepatotoxic compounds," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 142, no. 1, pp. 13–21, 1997.
- [28] S. Rossi, S. Gemma, L. Fabrizi, E. Testai, and L. Vittozzi, "Time dependence of chloroform-induced metabolic alterations in the liver and kidney of B6C3F1 mice," *Archives of Toxicology*, vol. 73, no. 7, pp. 387–393, 1999.
- [29] E. González-Jasso, T. López, D. Lucas et al., "CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes," *Toxicology Letters*, vol. 144, no. 1, pp. 55–67, 2003.
- [30] H. E. Hurst and M. Y. Ali, "Analyses of (1-chloroethenyl)oxirane headspace and hemoglobin N-valine adducts in erythrocytes indicate selective detoxification of (1-chloroethenyl)oxirane enantiomers," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 166, no. 1–3, pp. 332–340, 2007.
- [31] J. Roh, Y. H. Moon, and K. Y. Kim, "The cytogenetic effects of benzene and toluene on bone marrow cells in rats," *Yonsei Medical Journal*, vol. 28, no. 4, pp. 297–309, 1987.

- [32] G. Krishna and M. Hayashi, "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation," *Mutation Research*, vol. 455, no. 1-2, pp. 155-166, 2000.
- [33] J. W. Parton and M. L. Garriott, "An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four-week-old rats treated with known clastogens," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 29, no. 4, pp. 379-385, 1997.
- [34] P. E. Thomas, S. Bandiera, S. L. Maines, D. E. Ryan, and W. Levin, "Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity N-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsomes," *Biochemistry*, vol. 26, no. 8, pp. 2280-2289, 1987.
- [35] F. P. Guengerich, "Analysis and characterization of enzymes and nucleic acids," in *Principles and Methods of Toxicology*, A. W. Hayes, Ed., pp. 1625-1687, Taylor & Francis, Ann Arbor, Mich, USA, 4th edition, 2001.
- [36] V. M. Dávila-Borja, J. A. Belmont, J. J. Espinosa, R. Moreno-Sánchez, A. Albores, and R. D. Montero, "Induction of CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver by histamine: binding and kinetic studies," *Archives of Toxicology*, vol. 81, no. 10, pp. 697-709, 2007.
- [37] T. Omura and R. Sato, "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 239, pp. 2370-2378, 1964.
- [38] D. R. Koop, "Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a," *Molecular Pharmacology*, vol. 29, no. 4, pp. 399-404, 1986.
- [39] W. H. Habig and W. B. Jakoby, "Assays for differentiation of glutathione S-Transferases," *Methods in Enzymology*, vol. 77, pp. 398-405, 1981.
- [40] B. Mannervik and P. Jemth, "Unit 6.4 basic protocol: measurement of glutathione transferases," in *Current Protocols in Toxicology*, M. Maines, L. Costa, D. Reed, and S. Sassa, Eds., pp. 6.4.1-6.4.10, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- [41] M. E. Anderson, "Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples," *Methods in Enzymology*, vol. 113, pp. 548-555, 1985.
- [42] D. R. Janero and B. Burghardt, "Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation: influence of peroxidation conditions," *Lipids*, vol. 24, no. 2, pp. 125-131, 1989.
- [43] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121-126, 1984.
- [44] C. Beauchamp and I. Fridovich, "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels," *Analytical Biochemistry*, vol. 44, no. 1, pp. 276-287, 1971.
- [45] R. A. Lawrence and R. F. Burk, "Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 71, no. 4, pp. 952-958, 1976.
- [46] I. Carlberg and B. Mannervik, "Glutathione reductase," *Methods in Enzymology*, vol. 113, pp. 484-490, 1985.
- [47] F. Romagna and C. D. Staniforth, "The automated bone marrow micronucleus test," *Mutation Research*, vol. 213, no. 1, pp. 91-104, 1989.
- [48] R. Thier, T. Brüning, P. H. Roos et al., "Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 206, no. 3, pp. 149-171, 2003.
- [49] L. Wang, M. J. Groves, M. D. Hepburn, and D. T. Bowen, "Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages," *Haematologica*, vol. 85, no. 6, pp. 573-579, 2000.
- [50] P. J. Sherratt, M. M. Manson, A. M. Thomson et al., "Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1," *Biochemical Journal*, vol. 335, no. 3, pp. 619-630, 1998.
- [51] S. J. Oh, S. K. Kim, and Y. C. Kim, "Role of glutathione in metabolic degradation of dichloromethane in rats," *Toxicology Letters*, vol. 129, no. 1-2, pp. 107-114, 2002.
- [52] A. Pathiratne, R. L. Puyear, and J. D. Brammer, "A comparative study of the effects of benzene, toluene, and xylenes on their in vitro metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 82, no. 2, pp. 272-280, 1986.
- [53] A. E. Olvera-Bello, E. Estrada-Muñiz, G. Elizondo, and L. Vega, "Susceptibility to the cytogenetic effects of dichloromethane is related to the glutathione S-transferase theta phenotype," *Toxicology Letters*, vol. 199, no. 3, pp. 218-224, 2010.
- [54] A. I. Cederbaum, Y. Lu, and D. Wu, "Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury," *Archives of Toxicology*, vol. 83, no. 6, pp. 519-548, 2009.
- [55] D. Pankow, F. Matschiner, and H.-J. Weigmann, "Influence of aromatic hydrocarbons on the metabolism of dichloromethane to carbon monoxide in rats," *Toxicology*, vol. 68, no. 1, pp. 89-100, 1991.
- [56] S. K. Kim and Y. C. Kim, "Effect of a single administration of benzene, toluene or m-xylene on carboxyhaemoglobin elevation and metabolism of dichloromethane in rats," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 16, no. 15, pp. 437-444, 1996.
- [57] E. Testai, V. de Curtis, S. Gemma, L. Fabrizi, P. Gervasi, and L. Vittozzi, "The role of different cytochrome P450 isoforms in in vitro chloroform metabolism," *Journal of Biochemical Toxicology*, vol. 11, no. 6, pp. 305-312, 1996.
- [58] L. Fabrizi, G. W. Taylor, B. Cañas, A. R. Boobis, and R. J. Edwards, "Adduction of the chloroform metabolite phosgene to lysine residues of human histone H2B," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 16, no. 3, pp. 266-275, 2003.
- [59] E. Mohtashamipur, K. Norpoth, U. Woelke, and P. Huber, "Effects of ethylbenzene, toluene, and xylene on the induction of micronuclei in bone marrow polychromatic erythrocytes of mice," *Archives of Toxicology*, vol. 58, no. 2, pp. 106-109, 1985.
- [60] K. H. Mavournin, D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone, and J. A. Heddle, "The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program," *Mutation Research*, vol. 239, no. 1, pp. 29-80, 1990.