



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## **TÍTULO DEL PROYECTO**

**ÍNDICE DE ESTRÉS OXIDANTE EN LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A COMPUESTOS ORGÁNICOS  
VOLÁTILES, Y SU RELACIÓN CON POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE METABOLISMO DE  
XENOBIÓTICOS**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ VARGAS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS**

**DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. JULIETA RUBIO LIGTHBOURN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**DR. ARNULFO ALBORES MEDINA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV), IPN**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2018**



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.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## **TÍTULO DEL PROYECTO**

**ÍNDICE DE ESTRÉS OXIDANTE EN LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A COMPUESTOS ORGÁNICOS  
VOLÁTILES, Y SU RELACIÓN CON POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE METABOLISMO DE  
XENOBIÓTICOS**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ VARGAS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS**

**DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. JULIETA RUBIO LIGTHBOURN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**DR. ARNULFO ALBORES MEDINA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV), IPN**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2018**



Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de agosto del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **LÓPEZ VARGAS MARÍA DEL ROCÍO** con número de cuenta **515015737** con la tesis titulada **"Índice de Estrés Oxidante en la exposición crónica a Compuestos Orgánicos Volátiles, y su relación con polimorfismos genéticos de metabolismo de xenobióticos"** realizada bajo la dirección del **DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA:**

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Vocal: DRA. LETICIA HERNÁNDEZ CADENA  
Secretario: DR. ARNULFO ALBORES MEDINA  
Suplente: DR. RODOLFO OMAR ARELLANO AGUILAR  
Suplente: DRA. CYNTHIA ARMENDÁRIZ ARNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de octubre del 2018.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**





## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT por la beca de doctorado con número de apoyo 384944.

Al Programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado (PAEP)

A la RED de Salud Ambiental Infantil y a la International Society for Environmental Epidemiology por los apoyos para asistencia a congresos.

A la **Dra. Regina Dorinda Montero Montoya** por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza de permitirme desarrollar esta investigación que gracias a su guía ha estado llena de aprendizajes tanto académicos como personales. Y por ser ejemplo de lo que debe ser un buen líder.

A la **Dra. Julieta Rubio Ligthbourn** por el apoyo que me ha otorgado en todo este tiempo, por la disposición y opiniones en relación al proyecto y a mi formación.

Al **Dr. Arnulfo Albores Medina** por ayudarme a entender conceptos que en mis estudios de licenciatura solo eran ideas abstractas, por mostrarme su pasión por la enseñanza, pero sobre todo por el tiempo que me regaló para moldear mi pensamiento a uno mucho más crítico.

## Agradecimientos personales

A mis sinodales de examen de candidatura y de tesis por su mano dura y sus comentarios que enriquecieron en tanto este proyecto: Dra. Leticia Hernández Cadena, Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dra. Raquel Retana, Dra. Concepción Gutiérrez, Dr. Arnulfo Albores, Dra. Cynthia Armendáriz Arnez, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Omar Arellano.

A los Doctores Francisco Mercado Calderón y Luis Fernando Oropeza, y al personal del Laboratorio de Toxicología Ambiental del Hospital de Nanchital, PEMEX.

A la Lic. Alejandra Méndez directora del Centro Fray Julián Garcés de Derechos Humanos, así como a las personas que forman parte y colaboran con el centro, en especial a Isaías, Guadalupe y Alejandra.

Al Dr. Javier Belmont y Dr. Víctor Dávila.

Al Dr. Javier Espinoza y a su grupo de trabajo, especialmente a Sandra Hernández Ojeda. Al personal del laboratorio Xotepingo.

A los integrantes del laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental: MVZ Luis Serrano García, Karen Suárez, Selene Herrera, Paulina López, Nancy Mondragón, Rosa Beltrán, Betsy Guzmán, Damián Ordoñez, Uriel González, Antonio Araujo. A las secretarías del posgrado: Adriana López, Azucena Ayala y Mayra Ocegüera.

A mis padres y hermanos, a mi sobrina, a mis amigos, profesores, compañeros y alumnos, a los BCSC.

A todos mis donadores en la etapa de estandarización de la técnica de OSI.

A las personas de las comunidades que participaron en el estudio.

A Isaac, por impulsarme a ser una mejor persona en todos los aspectos.

## DEDICATORIA

A los niños que nos brindaron sus experiencias y muestras biológicas, este proyecto es por y para ellos y sus comunidades.

A las personas que con su lucha diaria nos dan la promesa de un mundo más justo social y ambientalmente.

A mi mamá, y a mi abuelita Petra †



<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Contaminación del aire y agua</b>	<b>3</b>
<i>1.1.1 Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) como indicadores de contaminación por VOC en aire</i>	<b>5</b>
• <i>1.1.1.1 Biotransformación de BTEX</i>	<b>6</b>
• <i>1.1.1.2 Modulación de la biotransformación de BTEX e interacción de los metabolitos con macromoléculas</i>	<b>7</b>
<b>1.2 Estrés oxidante y relación con exposición a xenobióticos</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Polimorfismos</b>	<b>9</b>
• <i>1.3.1 CYP2E1 RsaI</i>	<b>9</b>
• <i>1.3.2 NQO1 C609T</i>	<b>9</b>
• <i>1.3.3 GSTT1 nulo y GSTM1 nulo</i>	<b>10</b>
<b>1.4 Monitoreos biológicos en poblaciones humanas</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Monitoreo biológico en poblaciones cercanas a ríos contaminados en el mundo</b>	<b>12</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Establecimiento de la zona de estudio</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Determinación de BTEX en aire en las zonas de estudio</b>	<b>20</b>
<b>3 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO</b>	<b>21</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>5 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>21</b>
<i>5.1 Objetivos particulares</i>	<b>21</b>
<b>6 METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
<b>6.1 Población de estudio</b>	<b>23</b>
<b>6.2 Muestras biológicas (sangre venosa y orina)</b>	<b>23</b>
<b>6.3 Reactivos y equipos</b>	<b>23</b>
<i>6.3.1 Reactivos</i>	<b>23</b>
<i>6.3.2 Equipos</i>	<b>26</b>
<b>6.4 TOS (Estado Total Oxidante)</b>	<b>27</b>
<b>6.5 TAC (Capacidad Total Antioxidante)</b>	<b>28</b>
<b>6.6 OSI (Índice de estrés oxidante)</b>	<b>28</b>
<b>6.7 Determinación de metabolitos de BTEX en orina</b>	<b>29</b>
<i><u>6.7.1 Ac. fenilmercaptúrico</u></i>	<b>29</b>
<i><u>6.7.2 o-cresol</u></i>	<b>30</b>
<i><u>6.7.3 Ác. metilhipúricos (orto-, meta-, para-), ác. fenilgioxílico y ác. mandélico</u></i>	<b>31</b>
<b>6.8 Extracción de DNA</b>	<b>32</b>
<b>6.9 Polimorfismos estudiados</b>	<b>32</b>

<u>6.9.1 CYP2E1 RsaI</u>	32
<u>6.9.2 NQO1 C609T</u>	33
<u>6.9.3 GSTM1 y GSTT1 nulos</u>	34
<b>6.10 Análisis estadístico</b>	35
<b>7 RESULTADOS</b>	36
<i>7.1 Datos antropométricos y sociodemográficos</i>	36
<i>7.2 TOS, TAC y OSI</i>	38
<i>7.3 Metabolitos de BTEX en orina</i>	40
<i>7.4 Polimorfismos de CYP2E1, NQO1, GSTM1 y GSTT1</i>	42
<i>7.5 Puntaje Z de metabolitos de BTEX en orina</i>	42
<i>7.6 Selección de Lasso</i>	43
<i>7.7 Correlación de OSI con concentración de metabolitos en muestras biológicas de niños de Tepetitla de Lardizábal</i>	44
<b>8 DISCUSIÓN</b>	45
<b>9 CONCLUSIONES</b>	51
<b>10 EPÍLOGO</b>	52
<b>11 REFERENCIAS</b>	54
<b>12 ANEXOS</b>	62
• <b>Anexo I</b>	
<b>Volatile Organic Compounds in air: sources, distribution, exposure and associated illnesses in children</b>	
• <b>Anexo II</b>	
<b>Encuesta para establecer probables exposiciones crónicas a sustancias toxicas en comunidades de Tlaxcala</b>	
• <b>Anexo III</b>	
<b>Datos obtenidos en la encuesta de hábitos y factores confusores</b>	
• <b>Anexo IV</b>	
<b>Oxidative Stress Index is increased in children exposed to industrial discharges and is inversely correlated with metabolite excretion of VOC</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Emisiones de VOC provenientes de procesos industriales reportadas en Estados Unidos para el año 2014.	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura química del benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX).	<b>6</b>
<b>Figura 3.-</b> Estrés oxidante generado por la biotransformación de BTEX y por los procesos celulares normales de la mitocondria.	<b>8</b>
<b>Figura 4.-</b> Modelo de factores e implicaciones que inciden en la comprensión de la exposición de poblaciones a contaminantes ambientales.	<b>12</b>
<b>Figura 5.</b> Cuenca del Balsas.	<b>15</b>
<b>Figura 6.-</b> Municipios de estudio localizados en el estado de Tlaxcala.	<b>19</b>
<b>Figura 7.-</b> Localización de comunidades de estudio y puntos de muestreo de BTEX. Promedio de concentraciones de BTEX en aire ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) por municipio.	<b>20</b>
<b>Figura 8.-</b> Cromatograma de una muestra de orina para determinación de ácido fenilmercaptúrico.	<b>29</b>
<b>Figura 9.-</b> Cromatograma de una muestra de orina para determinación de <i>o</i> -cresol.	<b>30</b>
<b>Figura 10.-</b> Cromatograma de una muestra de orina para determinación de ác.metilhipúricos ( <i>orto-</i> , <i>meta-</i> , <i>para-</i> ), ác. fenilgloxílico y el ác. mandélico.	<b>31</b>
<b>Figura 11.-</b> Bandas en gel de agarosa al 3% de los genotipos del polimorfismo CYP2E1 <i>Rsa</i> I.	<b>32</b>
<b>Figura 12.-</b> Bandas en gel de agarosa al 3% de los genotipos del polimorfismo NQO1 <i>C609T</i> .	<b>33</b>
<b>Figura 13.-</b> Bandas de amplificación de GSTT1 y GSTM1.	<b>34</b>
<b>Figura 14.</b> Desarrollo de los niños en las comunidades de estudio de acuerdo con su Índice de Masa Corporal (IMC).	<b>37</b>

<b>Figura 15.-</b> Distribución en rangos intercuartiles de los parámetros de estrés oxidante de las muestras de plasma de niños de las comunidades de estudio.	<b>38</b>
<b>Figura 16.-</b> Distribución de las concentraciones de los metabolitos de BTEX en las muestras de orina de niños de las comunidades de estudio.	<b>41</b>
<b>Figura 17.-</b> Distribución de los datos de las variables lnOSI y puntaje Z de metabolitos para las muestras biológicas de los niños de las comunidades de estudio.	<b>43</b>
<b>Figura 18.-</b> a) Vías de biotransformación y bioactivación de BTEX. b) Vías de biotransformación y bioactivación de dicloroetano.	<b>49</b>
<b>Figura 19.-</b> Cartel explicativo de la problemática en la región afectada por la contaminación del río Atoyac.	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Estudios de monitoreo biológico relacionados con ríos contaminados y vigilancia epidemiológica.	<b>14</b>
<b>Tabla 2.-</b> Calidad del agua en cada municipio.	<b>16</b>
<b>Tabla 3.</b> Compuestos tóxicos presentes en el agua del río Atoyac (CONAGUA, 2011; Greenpeace, 2014) y afectaciones a órganos y sistemas.	<b>17</b>
<b>Tabla 4.-</b> Reactivos empleados para las metodologías utilizadas en el desarrollo del proyecto.	<b>23</b>
<b>Tabla 5.-</b> Equipos empleados para las metodologías utilizadas en el desarrollo del proyecto.	<b>26</b>
<b>Tabla 6.-</b> Moléculas oxidantes que forman parte de la composición del plasma sanguíneo y su contribución estimada en porcentaje al TOS.	<b>27</b>
<b>Tabla 7.-</b> Moléculas antioxidantes que forman parte de la composición del plasma sanguíneo y su contribución estimada a la TAC, en porcentaje.	<b>28</b>
<b>Tabla 8.-</b> Datos antropométricos y sociodemográficos de las poblaciones de estudio.	<b>36</b>
<b>Tabla 9.-</b> Parámetros de estrés oxidante medidos en plasma sanguíneo, y niveles de metabolitos en orina en las comunidades de estudio.	<b>39</b>
<b>Tabla 10.-</b> Frecuencia de alelos o genotipos y su correspondiente polimorfismo estudiado.	<b>42</b>
<b>Tabla 11.-</b> Resultados de la selección de Lasso para las variables polimórficas que correlacionaron con InOSI.	<b>43</b>
<b>Tabla 12.-</b> Variables que correlacionan con InOSI en el modelo lineal generalizado para las muestras biológicas de los niños de las comunidades de Tepetitla de Lardizábal, y comparación del mismo modelo con las muestras de los niños de la comunidad de San Juan Ixtenco.	<b>44</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A.C.	Asociación Civil
ACGIH	Conferencia Gubernamental Americana de Higienistas Ambientales
AhR	Receptor de aril hidrocarburo
AIC	Criterio de información de Akaike
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos
CAT	Catalasa
CG-FID	Cromatografía de gases-con detector de ionización de flama
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CONAPO	Consejo Nacional de Población
COP	Compuestos Orgánicos Persistentes
CYP2E1	Isoforma del Citocromo P450 2E1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPA	Agencia de Protección Ambiental
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva
FANTA	Proyecto de Asistencia Técnica para la Comida y Nutrición
GBD	Carga de Enfermedad Global
GPx	Glutación peroxidasa
GRed	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSTM1	Glutación S- transferasa M1
GSTT1	Glutación S- transferasa T1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HPLC-MS-MS	Cromatografía líquida de alta resolución-masas-masas
IARC	Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer
IMC	Índice de Masa Corporal
IMTA	Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
IUR	Unidad de Riesgo por Inhalación
InOSI	Variable normalizada obtenida transformando el OSI a logaritmo natural
NEC	Productos Químicos Nuevos y Existentes
NEI	Inventario Nacional de Emisiones
NQO1	NAD(P)H: Quinona Oxidoreductasa 1
Nrf2	Factor Nuclear Eritroide 2
<i>o, p, m</i>	Orto, meta y para
O.R.	<i>Odds ratio</i>
OGG1	8-oxoguanian DNA glicosilasa
OH <sup>*</sup>	Radical hidroxilo
ONG	Organizaciones No Gubernamentales

OSI	Índice de Estrés Oxidante
P.M. 2.5	Material Particulado de 2.5 micras de tamaño
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
Prx	Peroxiredoxinas
R.R.	Riesgo Relativo
REL	Retículo endoplásmico liso
RfC	Concentración de referencia de efectos críticos en humanos
RL	Radicales Libres
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SOD	Superóxido dismutasa
SOD2	Superóxido dismutasa 2
TAC	Capacidad Total Antioxidante
TOS	Estado Total Oxidante
Trx	Tiorredoxinas
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VOC	Compuestos Orgánicos Volátiles



## RESUMEN

El río Atoyac, ubicado en los estados de Tlaxcala y de Puebla en México, ha sido clasificado como altamente contaminado por las autoridades ambientales, varias comunidades se asientan en sus orillas, por lo que la contaminación ha afectado a alrededor de 1,5 millones de personas, así como a tierras agrícolas. El río recibe desechos de descargas industriales, principalmente en forma líquida, que contienen una gran cantidad de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC, por sus siglas en inglés), lo que da lugar a una distribución ambiental de los tóxicos en el área. Para demostrar que este ambiente afecta procesos fisiológicos importantes que tienen un impacto en la salud, realizamos un estudio en niños de pueblos pequeños en las orillas del río Atoyac y en otro pueblo similar ubicado lejos de él. Se estudiaron 91 y 93 niños (rango de edad: 8-12, sin enfermedad crónica diagnosticada) de cada sitio, se midió la excreción de metabolitos de los VOC modelo benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) en muestras de orina; se determinó el Índice de Estrés Oxidante (OSI) en muestras de plasma sanguíneo, calculado a partir del Estado Oxidante Total (TOS) y la Capacidad Antioxidante Total (TAC) (por sus siglas en inglés); y polimorfismos metabólicos relevantes que participan en la bioactivación-desintoxicación de la mayoría de los VOC: citocromo P450 isoforma 2E1 polimorfismo *RsaI* (CYP2E1 *RsaI*), NAD(P)H: quinona oxidorreductasa 1 polimorfismo *C609T* (NQO1 *C609T*) y polimorfismos *nulos* de las glutatión *S*-transferasas T1 y M1 (*GSTT1 nula* y *GSTM1 nula*). El OSI fue significativamente mayor en los niños que viven cerca del río ( $5.2 \pm 3.4$  frente a  $2.6 \pm 1.5$ , 95% C.I.). En este sitio, el OSI correlacionó con la disminución de la excreción de metabolitos de BTEX y la disminución de la TAC; también se observó una asociación con variantes alélicas de los polimorfismos metabólicos de CYP2E1 *RsaI c2c2*, NQO1 *C609T CC* y *GSTT1 presente*. Los problemas de salud esperados para estos niños a medida que crecen implican una amplia gama de trastornos, incluidos el cáncer y los riesgos de fertilidad para ellos y sus hijos.

## ABSTRACT

The Atoyac river located into Tlaxcala and Puebla states in Mexico, has been classified as highly polluted by environmental authorities, several communities are settled on its banks, affecting around 1.5 million persons, as well as farmland. The river receives waste from industrial discharges, mainly in liquid form, containing a large amount of volatile organic compounds (VOCs), thus giving rise to an environmental distribution of toxics in the area. To demonstrate that this environment affects important physiological processes that have an impact in health, we conducted a study of children from small communities on the banks of the river and in another similar town located far from it. 91 and 93 children (age 8-12, no diagnosed chronic disease), were studied from each site the excretion of metabolites of the VOC model benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) in urine samples was measured; the Oxidant Stress Index (OSI) was determined in blood plasma samples, calculated from the Total Oxidant State (TOS) and the Total Antioxidant Capacity (TAC); and relevant metabolic polymorphisms involved in the bioactivation-detoxification of most VOCs: cytochrome P450 isoform 2E1 *RsaI* polymorphism (CYP2E1 *RsaI*), NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 polymorphism *C609T* (NQO1 *C609T*) and *null* polymorphisms of glutathione S-transferases T1 and M1 (GSTT1 *null* and GSTM1 *null*). OSI was significantly higher in children living near the river ( $5.2 \pm 3.4$  vs.  $2.6 \pm 1.5$ , 95% C.I.). OSI was significantly higher in children living by the river ( $5.2 \pm 3.4$  vs  $2.6 \pm 1.5$ , 95% C.I.). At this site, OSI was correlated with diminishing BTEX metabolite excretion and a TAC; an association with allelic variants of the metabolic polymorphisms of CYP2E1 *c2c2*, NQO1 *C609T CC* and GSTT1 *present* was also observed. The expected health problems for these children as they grow older involves a wide array of disorders, including cancer and fertility risks for them and their children.

# 1 INTRODUCCIÓN

La contaminación del ambiente es un problema que nos involucra a todos ya que está propiciando cambios en el comportamiento de los ecosistemas y pérdida de biodiversidad en el planeta, además de que causa desórdenes fisiológicos, enfermedades y muertes prematuras en humanos en todo el mundo (Sorek-Hamer *et al.*, 2016; Landrigan *et al.*, 2017). Dentro de la clasificación de enfermedades no transmisibles, aproximadamente el 71% son enfermedades de origen ambiental, las más comunes son: enfermedad cardiovascular, muertes por cardiopatía isquémica, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y diversos tipos de cáncer. Se estima que en el 2015 ocurrieron 9 millones de muertes prematuras asociadas a enfermedades de origen ambiental, el 16% de la mortalidad mundial total (Landrigan *et al.*, 2017).

En los últimos años, las consecuencias de la contaminación ambiental se han tratado de abordar como parte de un proceso biológico complejo, con enfoques desde diversas disciplinas, en los que se toman en cuenta tanto factores inherentes de las poblaciones involucradas como son la composición y susceptibilidad genética, diferentes grupos de edad, tipo de alimentación, nivel socioeconómico, cultura, etc.; como factores externos a ellos, tales como la región geográfica, clima, fuentes emisoras de contaminantes ambientales, compuestos químicos liberados al ambiente, el comportamiento de mezclas de contaminantes químicos en las diferentes matrices ambientales, etc. Incluso se toma en cuenta el comportamiento de estas mezclas químicas dentro de los organismos a nivel molecular y la biotransformación que sufren, así como las interacciones sinérgicas, aditivas o de antagonismo que pueden ocurrir al presentarse en bajas dosis. Estas investigaciones han empezado a establecer modelos de evaluación de riesgos que incorporen información sobre la vinculación entre un evento iniciador a nivel molecular y un resultado adverso a nivel sistémico, con base en el concepto de exposición ambiental a mezclas de sustancias químicas en bajas concentraciones (Goodson *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016; EPA-IRIS 2017).

Además, en diversos foros mundiales se ha señalado la importancia de hacer estudios para comprender la problemática de cada país, e incluso, en regiones específicas de éstos, ya que los determinantes de la respuesta de las comunidades pueden tener toda una gama de variaciones dependientes de los factores antes mencionados. Tales enfoques deben ser vistos como un paso razonable dentro de las investigaciones en epidemiología molecular y la toxicología ambiental y, en última instancia, para las prácticas de evaluación de riesgos en todo el mundo.

## 1.1 Contaminación del aire y agua

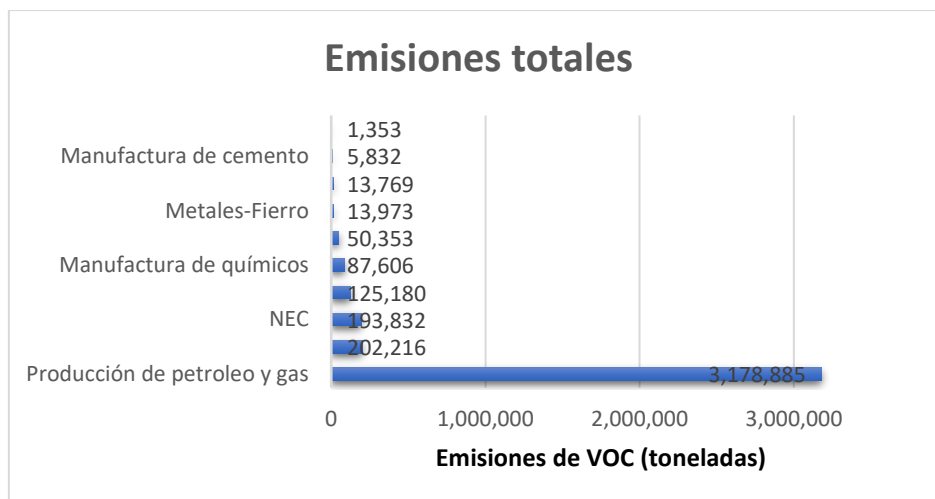
El número de muertes humanas en 2012 asociadas con contaminación del aire y contaminación del agua fue de 6.5 y 1.8 millones, respectivamente (GBD, 2015); si bien la contaminación asociada con estilos de vida tradicionales y con pobreza extrema está disminuyendo, se ha visto un aumento en la contaminación provocada por la industria, la minería, la generación de electricidad, la agricultura mecanizada y por los vehículos impulsados por fuentes de petróleo, es decir, actividades que están relacionadas con un rápido “desarrollo” en países de medianos a bajos ingresos (Landrigan *et al.*, 2017) en los que generalmente no va acompañado de medidas de protección al ambiental y por consecuencia, todas las matrices ambientales se impactan seriamente, directa o indirectamente. En

este contexto, la Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha declarado que la contaminación externa del aire es cancerígena (IARC, 2016).

En las últimas décadas se ha presentado una crisis hídrica en todo el mundo, propiciada por el incremento en el consumo de agua *per capita* debido al aumento de la población y la demanda por parte de la industria, incluida la agroindustria, además, esta situación es agravada porque el agua dulce apta para consumo se está viendo reducida por causa de la contaminación (ONU, 2015). Se sabe que las poblaciones marginadas son las más vulnerables y que resultan más afectadas (ONU 2015; Chen *et al.*, 2015; Abe y Simone *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2016; Ancona *et al.*, 2016), en conjunto con las poblaciones que se localizan asentadas en las riberas de ríos contaminados, en las cuales se ha observado hasta un 2.26 de Riesgo Relativo (R.R.) a desarrollar cáncer en diversos órganos (San Sebastián *et al.*, 2001; Verkasalo *et al.*, 2004; San Sebastián *et al.*, 2004), así como un *Odds Ratio* (O.R.) de 2.13 de padecer enfermedades respiratorias, renales, hepáticas y neurodegenerativas (Juang *et al.*, 2010) y de 2.7 de presentar algún tipo de desorden reproductivo (abortos, anomalías congénitas) (Stassen *et al.*, 2012).

Algunos de los contaminantes químicos de importancia para la salud que son vertidos al agua, incluyen material particulado, metales, Compuestos Orgánicos Persistentes (COP), y algunos materiales de uso doméstico e industrial; de particular interés son los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC), que dadas sus características fisicoquímicas, tienen la capacidad de volatilizarse (como su nombre lo indica) e integrarse fácilmente al aire, de esta forma se pueden movilizar hasta llegar a comunidades en donde ingresan a los organismos por vía aérea o dérmica, principalmente, y causar padecimientos como asma, dermatitis atópica, problemas neurológicos, entre otros (IARC, 2016; WHO, 2016).

La facilidad de dispersión a través del aire de los VOC es un grave problema, ya que algunos de estos compuestos, como el benceno, el 1,3-butadieno y el cloruro de vinilo, están catalogados por la IARC dentro del grupo 1, es decir, como carcinógenos para el ser humano (IARC 2012). Los VOC son contaminantes que afectan la calidad del aire por sí mismos, pero además, son precursores en la formación de ozono troposférico (Ait-Helal *et al.*, 2014) y contribuyen a la formación del material particulado menor de 2.5 micrómetros de diámetro (PM 2.5). Por la importancia que tienen los VOC a nivel industrial es posible encontrarlos de manera ubicua en todo el mundo, y en mayores concentraciones en grandes ciudades, en áreas cercanas a complejos industriales y en afluentes en donde son vertidos como residuos. El Inventario Nacional de Emisiones (NEI) de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), informó que en el 2014 de las emisiones debidas a procesos industriales, la producción de petróleo y gas fueron las actividades que contribuyeron en mayor medida con las emisiones de VOC a la atmósfera llegando a más de 3 millones de toneladas en ese año, seguido por almacenamiento y transporte, y productos Químicos Nuevos y Existentes (NEC) con alrededor de 200 mil toneladas, mientras que las refinerías de petróleo emitieron poco más de 50 mil toneladas (Figura 1) (EPA, 2016).



**Figura 1.-** Emisiones de VOC provenientes de procesos industriales en Estados Unidos para el año 2014. Tomada y traducida de los datos de la EPA 2016.

### 1.1.1 Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) como indicadores de contaminación por VOC en aire

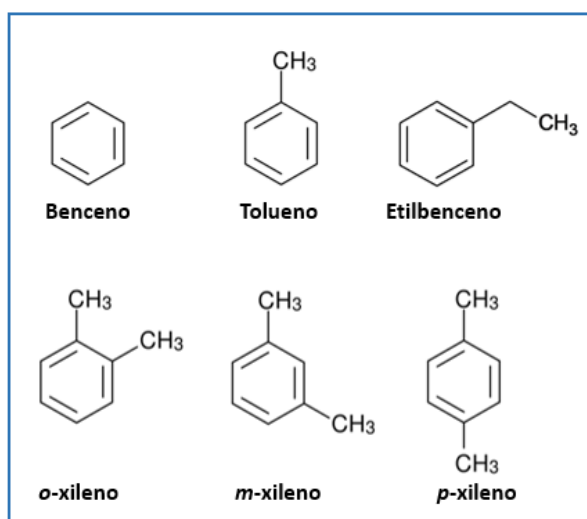
Los VOC más estudiados son el benceno, tolueno, etilbenceno y los xilenos (*orto, meta y para*) que en conjunto son conocidos como BTEX (Figura 2), son utilizados como modelos en investigación porque comprenden a más del 60% de los VOC encontrados en áreas urbanas. Los BTEX se encuentran de forma natural en el petróleo crudo, diésel y gasolina, por lo que son liberados al ambiente en su combustión; además son ampliamente utilizados en la industria como aditivos y precursores de otras sustancias (ATSDR 2004; EPA 2011). Los BTEX coexisten como mezclas en la atmósfera en prácticamente todos los ecosistemas, la composición de la mezcla puede ser muy variable y depende en gran medida de las fuentes cercanas, del tipo de industria que los emite, además de las actividades que se desarrollen en la región y de las condiciones ambientales. Estos compuestos pueden encontrarse contaminando, además del aire, al suelo y al agua, ya que, como se mencionó, sus características fisicoquímicas les confieren gran capacidad de dispersión, y una vez liberados al ambiente pueden volatilizarse, disolverse, adherirse a las partículas de suelo o ser degradados biológicamente (Batterman *et al.*, 2014; Bolden *et al.*, 2015). Las mayores concentraciones de BTEX se han encontrado en áreas con alta actividad industrial, seguido de las grandes ciudades debido a la problemática del tránsito vehicular y a los afluentes en donde son descargados como residuos (Sosa *et al.*, 2009, Batterman *et al.*, 2014).

En la Tabla 4 del anexo I se presentan los niveles de exposición ambiental medidos en nueve investigaciones en poblaciones cercanas a fuentes de BTEX, como zonas industriales, grandes ciudades, refinerías, y zonas cercanas a ríos con descargas industriales, en todos los casos, las concentraciones reportadas son inferiores a las concentraciones de referencia que provocan efectos críticos en humanos (RfC) estipulados por la EPA para efectos no carcinógenos. Sin embargo, para el benceno, compuesto reconocido como carcinógeno para humanos, la mayoría de los datos descritos se encuentran cercanos o por encima de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de benceno en aire, valor establecido en la unidad de

riesgo por inhalación (IUR) para incrementar el riesgo de un individuo de desarrollar cáncer al estar expuesto durante toda su vida (US-EPA, 2012).

- **1.1.1.1 Biotransformación de BTEX**

Los compuestos BTEX son hidrocarburos aromáticos, en cuya estructura química presentan un anillo bencénico, y en el caso del tolueno y el etilbenceno, el anillo está monosustituido con un grupo metil y un grupo etil, respectivamente; el anillo de los xilenos está disustituido con grupos metil, de tal forma que la mezcla de xilenos comprende a los compuestos orto, meta y para (*o*, *m*, *p*) de acuerdo con la posición de los sustituyentes en el anillo (Figura 2) (Yu *et al.*, 2011). Los BTEX son compuestos poco reactivos, por lo que su toxicidad está determinada por su biotransformación dentro del organismo (Barreto *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Estructura química del benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX).

El metabolismo y la eliminación de los BTEX parecen ser cualitativamente similares en seres humanos y otros mamíferos (ATSDR,2004). A bajas concentraciones de exposición, el primer paso en la biotransformación de estos compuestos es la oxidación mediada principalmente por CYP2E1, aunque también pueden participar otras isoenzimas del citocromo P-450 como CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP1A2, CYP1A1 en orden decreciente (ATSDR,2004). Si tal oxidación se da en los carbonos del anillo se forma un epóxido que resulta altamente reactivo, pero en tolueno, etilbenceno y xilenos la oxidación, además, puede darse en los sustituyentes (o cadenas laterales), formando diversos compuestos menos tóxicos como alcohol bencílico, 1-fenil etanol, o alcohol metil bencílico (ATSDR 1997, ATSDR 2004; Yu *et al.*, 2011). Como mecanismo de conjugación de fase II, los epóxidos pueden reaccionar con moléculas de glutatión por acción de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) de las familias *mu*, *tetha* y *pi* en humanos, y formar ácidos mercaptúricos de fácil excreción. Los metabolitos oxidados de tolueno y xilenos se pueden conjugar con glicina y formar ácido hipúrico y ácido metil hipúrico, respectivamente. La conjugación con azúcares como el ácido glucurónico puede ser otra ruta para la eliminación de estos compuestos, por ejemplo, a partir del ácido benzoico en el metabolismo del tolueno, puede formarse acil glucurónido; asimismo, también pueden formarse metabolitos

sulfatados de benceno, tolueno y xilenos (ATSDR 2004). En dosis bajas, el benceno puede transformarse en metabolitos tóxicos que incluyen al epóxido u óxido de benceno, al dihidrodiol de benceno, la hidroquinona, el catecol, las benzoquinonas y el muconaldehído, mientras que, a dosis altas, el benceno inhibe la formación de hidroquinona a partir del fenol (ATSDR 1997; Johnson *et al.*, 2007).

- **1.1.1.2 Modulación de la biotransformación de BTEX e interacción de los metabolitos con macromoléculas**

Las múltiples vías involucradas en el metabolismo de BTEX (Figura 3) proporcionan oportunidades para la modulación de su biotransformación, siendo varios los eventos dentro de estas vías en los que se pueden formar intermediarios químicos que causan daño a macromoléculas, afectando a las vías mismas de su metabolismo, o del metabolismo general de la célula. Algunos de estos eventos pueden ser: la competencia con otros productos químicos por el sitio activo de los diversos citocromos P-450, la inducción o la inhibición de estas enzimas; también tienen un papel relevante los polimorfismos genéticos que portan las poblaciones y que pueden modular la biotransformación de los xenobióticos, por ejemplo los polimorfismos de isoformas de citocromo P-450, así como los de enzimas de fase II como las GST, y NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO1), y de la respuesta antioxidante, como peroxirredoxinas (Prx) y tiorredoxinas (Txr), entre otras. En conjunto, la actuación de todos estos factores puede generar abundantes moléculas oxidantes, y éstas podrían ser inactivadas en dosis muy bajas, pero al sumarse podrían aumentar sus efectos tóxicos o bien, potenciarse en un efecto sinérgico (Medinsky *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2007). Los intermediarios reactivos formarían aductos con macromoléculas celulares (ácidos desoxirribonucleico DNA, ácidos ribonucleico RNA, lípidos o proteínas) conduciendo a la disfunción en órganos y tejidos blanco, y que en el DNA pueden resultar en mutaciones y carcinogénesis.

El metabolismo de fase I propicia la elevación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) generados por los ciclos catalíticos del citocromo P-450, y su aumento excesivo lleva al aumento de radicales libres, y esto al agotamiento del glutatión (GSH), molécula antioxidante clave en el mantenimiento de la homeostasis celular. El metabolismo de las quinonas cobra relevancia por estar relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, al aportar especies químicas generadoras de más estrés oxidante en condiciones de exposición a xenobióticos (Barreto 2009; Li *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016).

Este es el escenario que se presenta en las células de organismos expuestos de manera crónica a diversos xenobióticos, y es por eso que el estrés oxidante se plantea como uno de los principales mecanismos de generación de daño por exposición a BTEX.

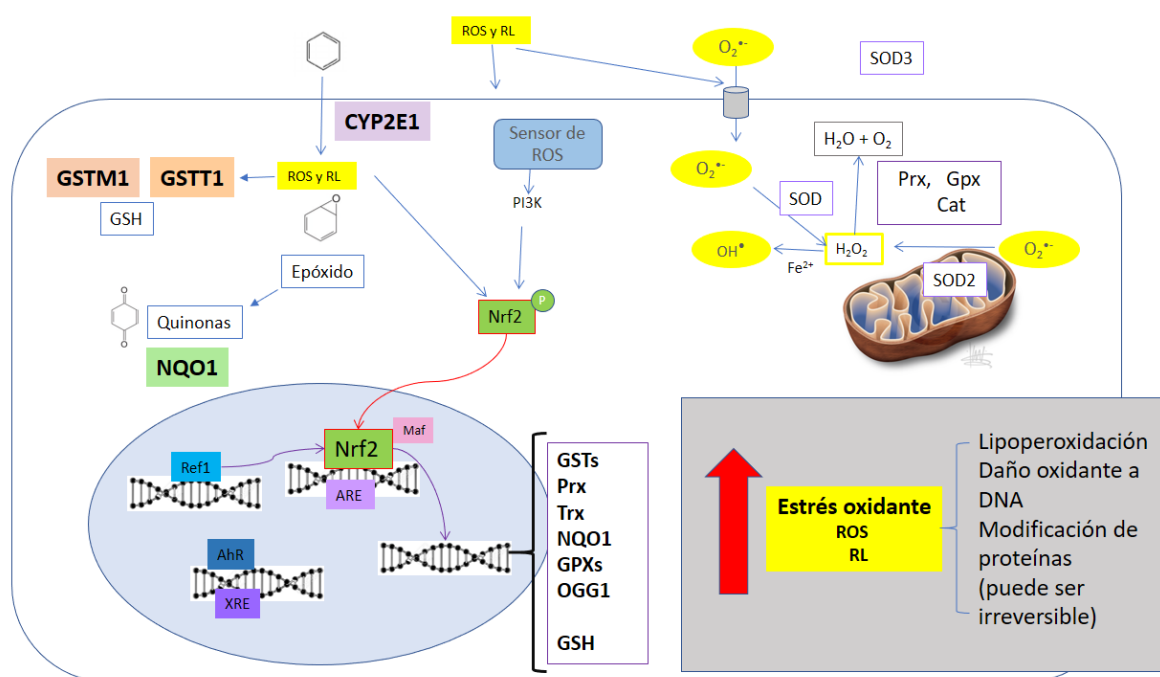
## **1.2 Estrés oxidante y relación con exposición a xenobióticos**

En la mitocondria se lleva a cabo, a través de la fosforilación oxidante, la producción de la energía necesaria para mantener las funciones celulares (Figura 3). En estas reacciones se liberan electrones que generan radicales libres o metabolitos del oxígeno altamente reactivos: en primera instancia se genera el radical superóxido, y a partir de él con la acción de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 2 (SOD2) se produce peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que en presencia de metales de



transición como Fe, a través de la reacción de Fenton, se rompe para formar radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), particularmente reactivos. Estas especies químicas derivadas del  $\text{O}_2$  son más reactivas que el oxígeno molecular, y se conocen como ROS (Kohen y Nyska, 2002). Además de la superóxido dismutasa (SOD), la célula cuenta con catalasas y peroxidasas para regular las ROS, que transforman el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y así mantienen la homeostasis celular. Las ROS son esenciales para el correcto funcionamiento de la célula, ya que en concentraciones bajas estimulan un gran número de procesos celulares, y están adecuadamente reguladas por las enzimas antioxidantes ya mencionadas. Sin embargo, en condiciones de enfermedad, envejecimiento o de exposición crónica a xenobióticos, la cantidad de ROS rebasa la capacidad de neutralización de las enzimas antioxidantes, provocando un fenómeno conocido como estrés oxidante (Kohen y Nyska, 2002; Riechelmann, 2004; Jones, 2008).

En particular durante una exposición crónica a xenobióticos, el retículo endoplásmico liso (REL) es otra fuente de ROS muy activa, ya que las enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos se encuentran en él, por ejemplo, CYP2E1 y demás isoformas del citocromo P-450 son enzimas específicas de membrana del REL (Riechelmann, 2004). Los ROS generados en la biotransformación de xenobióticos, conducen al daño de proteínas, lípidos de membrana y DNA, principalmente.



**Figura 3.-** Estrés oxidante generado por la biotransformación de BTEX (izquierda) y por los procesos celulares normales de la mitocondria (derecha), regulación génica del aumento de estrés oxidante y efectos en macromoléculas por el incremento de moléculas pro oxidantes. ROS: especies reactivas del oxígeno, RL: radicales libres, CYP2E1: citocromo P450 2E1, GSTT1 y GSTM1: glutatión S-transferasa T1 y M1, NQO1: NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1, Nrf2: factor nuclear eritroide 2, ARE: elemento de respuesta antioxidante, AhR: receptor de aril hidrocarburo, XRE: elemento de respuesta a xenobióticos, Prx: peroxiredoxinas, Trx: tioxiredoxinas, GPXs: glutatión peroxidasas, OGG1: 8-oxoguanina DNA glicosilasa, GSH: glutatión, SOD: superóxido dismutasa, Cat: catalasa (Elaboración personal).

### 1.3 Polimorfismos

Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes, que se presentan con una frecuencia de, al menos, el 1% en una población; pueden producirse por sustitución de pares de bases, delección total o parcial de un gen, inserción de nucleótidos o de secuencias de nucleótidos, cambios en el número de secuencias repetidas, etc. (Vogel, Piao 2011). La presencia de polimorfismos en los genes puede dar como resultado un cambio en los niveles de expresión y/o de actividad de la enzima que se codifique, lo primero está relacionado con un cambio de la secuencia del gen en la región promotora, donde se regula su expresión, mientras que lo segundo puede deberse a una alteración en la estructura de la proteína que ocasiona que la enzima altere su actividad, o bien, que disminuya su vida media. De esta manera, los polimorfismos genéticos originan variaciones en las funciones de estas enzimas que pueden alterar la biotransformación de los xenobióticos, confiriendo así diferentes susceptibilidades por la exposición a estos compuestos químicos (Vineis *et al.*, 1999). Tal es el caso de los polimorfismos que codifican enzimas relacionadas con la biotransformación de VOC: CYP2E1 *RsaI*, GSTT1 *nulo*, GSTM1 *nulo* y NQO1 *C609T*, (Nelson *et al.*, 1995; Malats *et al.*, 2000; Eguchi-Ishimae *et al.*, 2005) cuya actividad además, puede contribuir a elevar el estrés oxidante celular (Figura 3).

- 1.3.1 CYP2E1 *RsaI*

La enzima de metabolismo de fase I CYP2E1 es una *N*-nitrosodimetilamina dimetilasa que se encarga de metabolizar una amplia variedad de xenobióticos como alcoholes, aldehídos, ácidos grasos, cetonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, etilcarbamatos, disolventes halogenados, además de VOC como benceno, tolueno, xilenos, entre otros (Lucas *et al.*, 2001). El gen de esta enzima en seres humanos se ubica en el cromosoma 10, en la región 10q2403-qter, y tiene una longitud de 11413 pares de bases (pb), codifica una proteína de 493 residuos de aminoácidos (Piao *et al.*, 2003). El gen CYP2E1 es polimórfico, el polimorfismo CYP2E1 *RsaI* (*C1019T*) se encuentra en la región 5' del gen, y es causante de mayor actividad transcripcional de la enzima, hasta 10 veces más que el genotipo silvestre (Hayashi *et al.*, 1991). La presencia homocigota de este polimorfismo en comunidades humanas, se ha asociado positivamente con el riesgo a desarrollar cáncer gastrointestinal (Chong *et al.*, 2014) y de las vías urinarias (Fang *et al.*, 2017); se ha encontrado asociación de protección en la susceptibilidad a cáncer de pulmón (Q *et al.*, 2018); mientras que en otros trabajos no se le ha relacionado con el desarrollo de cáncer (Wong *et al.*, 2000) o susceptibilidad por exposición ambiental a xenobióticos (Yerena *et al.*, 2005).

- 1.3.2 NQO1 *C609T*

La NAD(P)H: quinona oxidoreductasa es una flavoenzima que reduce quinonas a hidroquinonas mediante un mecanismo de 2 electrones (Traver *et al.*, 1997), es altamente inducible y está implicada en la adaptación celular al estrés (Ross y Siegel 2017). Su gen en humanos está en el cromosoma 16 en la región 16q22.1, formado por 845 pb, su proteína tiene 240 residuos de aminoácidos (Strausberg *et al.*, 2002; Lienhart *et al.*, 2014). La variante polimórfica NQO1 *C609T* se asocia con la pérdida de la función enzimática por la inestabilidad de la proteína que se forma al reemplazar una prolina en el sitio 187 de la proteína a serina (Eguchi-Ishimae *et al.*, 2005; Lienhart *et al.*, 2014). El genotipo que porta

ambos alelos mutantes presenta alta susceptibilidad a hematotoxicidad y leucemia mieloide aguda por exposición al benceno (Lan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Dougherty *et al.*, 2008).

- 1.3.3 GSTT1 *nulo* y GSTM1 *nulo*

Las glutatión S-transferasas (GST) conforman una familia de enzimas de metabolismo de fase II que intervienen en la biotransformación de xenobióticos, catalizan la unión de GSH con metabolitos o compuestos padre electrófilos para facilitar su excreción o degradación (Vineis *et al.*, 1999; Giri *et al.*, 2011). En humanos se han descrito 6 familias: alpha, mu, pi, theta, zeta y omega, de éstas, las subfamilias GSTT1 y GSTM1 son las que se han relacionado con mayor frecuencia con patologías (Katoh *et al.*, 1996; Malats *et al.*, 2000).

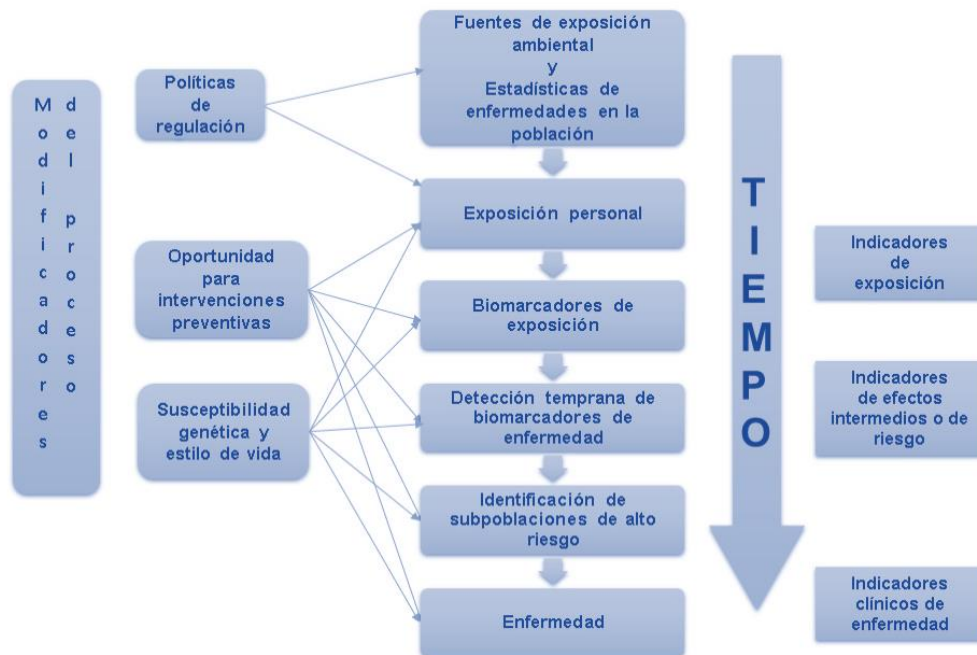
El gen *GSTT1* en humanos está ubicado en el cromosoma 22 en la región 22q11.23, con una longitud de 1002 pb, forma una proteína de 122 aminoácidos, es polimórfico, el alelo silvestre es funcional y el alelo mutado no es funcional por la delección total o parcial del gen (Pemble *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2004). Esta enzima está involucrada en la conjugación de moléculas de bajo peso molecular como óxido de etileno, benzoquinona, mono y dihalometanos, entre otros compuestos con el GSH. La GSTT1 también se asocia con la bioactivación de algunos xenobióticos, como los dihalometanos a los que conjuga con GSH formando metabolitos carcinógenos y mutágenos (Pemble *et al.*, 1994; Akiba *et al.*, 2017). El genotipo nulo, además, se ha asociado con la aparición de cáncer colorrectal y cáncer gástrico (Kumar *et al.*, 2011; Lao *et al.*, 2014).

El gen *GSTM1* se encuentra en el cromosoma 1 en la región 1p13.3, tiene 5950 pb, su transcripción forma una proteína de 218 residuos de aminoácidos. Presenta varios polimorfismos, pero el más relevante es la delección de una región del gen que provoca la pérdida de la función enzimática (Comstock *et al.*, 1999). La enzima cataliza la conjugación con glutatión de derivados oxidados de hidrocarburos aromáticos policíclicos y de alquilos, además de epóxidos. *GSTM1* nulo se ha asociado con el desarrollo de enfermedades como arterioesclerosis y diferentes tipos de cáncer (Malats *et al.*, 2000; Wahner *et al.*, 2007; Q *et al.*, 2018).

## 1.4 Monitoreos biológicos en poblaciones humanas

Las investigaciones epidemiológicas como el monitoreo biológico pueden proporcionar información valiosa con respecto a las asociaciones entre exposiciones ambientales y efectos a la salud humana, y a través de ellas es posible estimar los riesgos a la salud en comunidades específicas expuestas, con lo que se evita la incertidumbre de las extrapolaciones de animales a humanos y de las dosis de exposición a mezclas complejas. Los estudios de monitoreo biológico también sirven para detectar de manera temprana los efectos nocivos que pudieran llevar al desarrollo de enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares, insuficiencia renal, asma, problemas neurológicos, problemas reproductivos, atopías, etc. (Figura 4), de esta forma es posible diseñar programas de prevención que minimicen los riesgos y el impacto económico que las enfermedades generan en las poblaciones (López y Montero, 2018).

El monitoreo biológico en diferentes regiones del mundo es relevante porque cada país cuenta con una amplia variedad de exposiciones ambientales, dependiendo del tipo de actividades principales, es decir, de las industrias y las actividades productivas (Finkelman *et al.*, 2010). La epidemiología molecular ha apoyado en la comprensión de este problema complejo, de tal forma que se cuenta con una batería de biomarcadores que sirven como herramientas valiosas para la prevención de daño a la salud de las poblaciones y para distinguir a los individuos expuestos de los no expuestos, discriminar entre los expuestos más susceptibles, así como evaluar los efectos a bajas dosis de mezclas complejas de sustancias tóxicas, a partir de la medición de las concentraciones de los productos químicos o de sus metabolitos en muestras de diferentes tejidos biológicos como son sangre y orina (Figura 4) (Gamboa *et al.*, 2008; Coccini *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2016; Montero 2016). Según Vineis y Garte (2008) se reconocen cuatro tipos principales de biomarcadores: 1) de exposición, que demuestran la presencia de metabolitos o del compuesto tóxico dentro del organismo, cuya medición es posible realizarse en muestras de sangre (plasma o suero), orina, cabello o uñas, aire exhalado, etc. (Vaught y Henderson 2011); 2) de efecto temprano, 3) de efecto intermedio: ambos tipos de biomarcadores se caracterizan por ser alteraciones en las funciones celulares, en las moléculas o en los mecanismos metabólicos que pueden relacionarse con el desarrollo temprano o intermedio de una enfermedad, son de gran ayuda porque se pueden identificar antes de que el individuo presente síntomas clínicos y sea diagnosticado con un padecimiento; y 4) de susceptibilidad, son biomarcadores que indican una condición de vulnerabilidad o sensibilidad del individuo o de una población si es expuesta a contaminantes, dentro de este tipo de biomarcador se encuentran los polimorfismos en los genes de enzimas de biotransformación de xenobióticos (Vineis *et al.*, 1999).



**Figura 4.-** Modelo de factores e implicaciones que inciden en la comprensión de la exposición de poblaciones a contaminantes ambientales. (Modificado de Wang y Groopman, 2011).

### 1.5 Monitoreo biológico en poblaciones cercanas a ríos contaminados en el mundo

Las descargas de efluentes urbanos e industriales en los sistemas fluviales de gran parte del mundo se han convertido en un riesgo para la salud humana y para los ecosistemas, como ya se describió anteriormente. Con estudios de monitoreo ambiental se han caracterizado los tipos de contaminantes vertidos en los ríos, y los estudios de monitoreo biológico permiten demostrar la exposición mediante la determinación de los contaminantes o sus metabolitos en muestras biológicas, así como determinan la presencia de biomarcadores tempranos de riesgo de enfermedades crónicas, y con ayuda de los modelos de georreferenciación se ha determinado el riesgo relativo a desarrollar estos padecimientos (Jarup 2004; Juang *et al.*, 2010; López y Montero, 2018). Algunos ejemplos de estos esfuerzos por comprender la aparición de enfermedades en comunidades cercanas a ríos se presentan en la Tabla 1. Cabe destacar que los estudios descritos son de afluentes cuyas aguas no se utilizan para el consumo humano, ni para desarrollar actividades recreativas.

En México, se cuenta con información de monitoreos de este tipo en relación con los ríos Verde y Santiago en Jalisco, los ríos Zahuapan y Atoyac en Tlaxcala-Puebla y el río Coatzacoalcos en Veracruz. En estos, además de las descargas municipales, se vierten desechos industriales sin ningún tipo de tratamiento, y se han encontrado metales como aluminio, cromo, cobre, zinc y plomo, y metaloides como manganeso y arsénico, en concentraciones que exceden los límites permisibles determinados por la Agencia para Sustancia Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Conferencia Gubernamental Americana de Higienistas Ambientales (ACGIH) (Hansen y González, 2010; García-Nieto *et al.*, 2011; Barceló *et al.*, 2012); a esto se suma la presencia

de VOC, como son benceno, tolueno, cloroformo y cloruro de vinilo, además de disruptores endócrinos, plaguicidas, contaminantes emergentes, etc. (CONAGUA, 2008; Sandoval *et al.*, 2009; Arellano *et al.*, 2012; Cotler, 2012).

En Latinoamérica y en México, la comunidad científica está interesada en esta problemática desde hace años, y se han realizado ya varios estudios en los que se determinan los riesgos a la salud existentes en diversas comunidades.

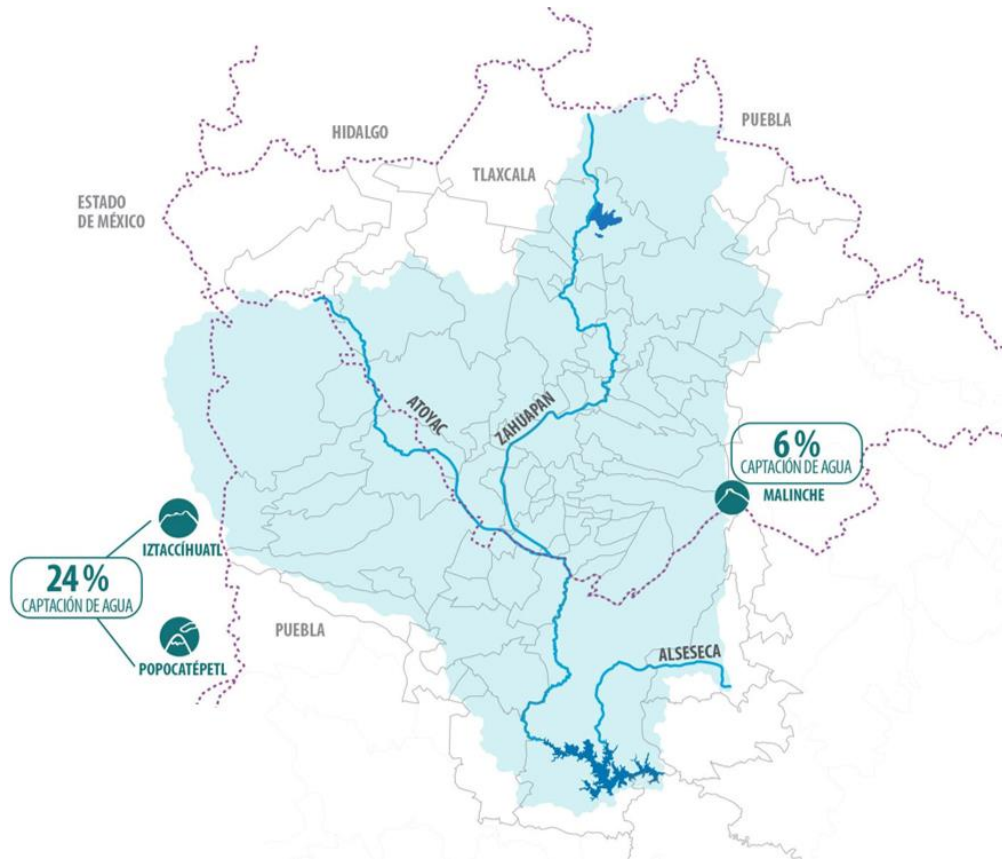
**Tabla 1.-** Estudios de monitoreo biológico relacionados con ríos contaminados y vigilancia epidemiológica (modificada de López y Montero, 2018).

Río o lago, país	Distancia de la población de estudio al río	Tipo de población	Tipo de contaminantes	Enfermedades asociadas determinadas en la investigación	Herramienta o bioindicador	Biomarcador	Riesgo	Cita
Kymijoki, Finlandia	Menos de 20 km	Agricultores	Dioxinas, dibenzofuranos	Cáncer	Bases de datos del Finnish Cancer Registry de 1980 al año 2000, y SMASH (Small-Area Statistics on Health)	No determinado	Riesgo relativo 1.13 95% IC, (0.97–1.32)	Verkasalo <i>et al.</i> , 2004
Río Fong Shan, Taiwan	Máximo 1 km	Población general	Compuestos orgánicos volátiles	Enfermedades crónicas (respiratorias, renales, hepáticas, cerebro y sistema nervioso central)	Muestras de aire. Encuesta de salud, con un modelo de muestreo aleatorio estratificado	No determinado	<i>Odds ratio</i> 3.13	Juang <i>et al.</i> , 2010
Región de ríos en el Norte de Grecia	No especificado	No especificado	147 plaguicidas y metabolitos : organoclorados, organofosforados, triazinas, chloroacetanilidas, piretroides, carbamatos, ftalamidos	Determinación de riesgos por efectos críticos no carcinógenos, y por efectos carcinógenos	Muestras de agua. Determinación de un cociente de peligrosidad a partir de la base de datos de concentraciones de referencia (Rfc) de los plaguicidas y metabolitos de estudio, establecidos por la EPA-IRIS	No determinado	Cociente de peligrosidad plaguicidas no cancerígenos 4.88, plaguicidas cancerígenos 9.1	Papadakis <i>et al.</i> , 2015
Río Akaki, Etiopía	No especificado	Población general	Metales: cadmio, plomo, manganeso, mercurio, selenio en sangre y orina. Arsénico, cadmio, cromo, cobalto, cobre, plomo, manganeso, mercurio en agua del río	No especificado	Encuesta directa. Muestras de agua del río	Muestras de sangre y orina	No determinado	Yard <i>et al.</i> , 2015
Río Pilcomayo, Bolivia	No especificado	Mujeres indígenas Wichi e hijo menor	Cadmio y plomo	Desórdenes reproductivos: abortos, anomalías congénitas, familias pequeñas, retraso en aprender a caminar	Encuesta directa. Muestras de agua del río	Muestras de cabello	<i>Odds ratio</i> 2.7	Stassen <i>et al.</i> , 2012
Río Puyango, Ecuador	A 120 km aguas debajo de la zona minera	Niños menores de 11 años	Manganeso	Desórdenes en el neurodesarrollo	Encuesta directa. Test de neurodesarrollo con pruebas de inteligencia	Muestras de cabello	No determinado	Betancourt <i>et al.</i> , 2015
Río Kakehashi, Japón	No especificado	Habitantes ribereños (60 años de edad) residentes mínimo 22 años	Cadmio	Disfunción tubular renal	Encuesta directa	Cadmio en orina y $\beta$ 2-microglobulina	No determinado	Phuc <i>et al.</i> , 2016



## 2 ANTECEDENTES

El río Atoyac forma parte de la Cuenca del Balsas de la Región Hidrológica 18, es una corriente de 200 km que atraviesa 7 municipios de Tlaxcala y 11 de Puebla (CONAGUA, 2008; Méndez-Serrano *et al.*, 2017) (Figura 5). Es uno de los ríos más deteriorados en el país, las mayores causas son la urbanización y la industrialización que se ha dado en los últimos 50 años, iniciada con la instalación de la planta de Volkswagen en Puebla, seguida con la creación del complejo petroquímico Independencia, y en la siguiente década con el crecimiento de los corredores industriales Quetzalcóatl, Ixtacuixtla y Huejotzingo, además de la maquila intraurbana (Méndez-Serrano *et al.*, 2017). De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2008), el 66% de las descargas provenientes de estos complejos industriales se realiza directamente al río Atoyac, sin recibir un tratamiento previo, mientras que el 44% de las descargas industriales restantes reciben tratamiento primario o deficiente, además, al río también se vierten descargas residuales domésticas y escurrimientos de la actividad agrícola que contienen plaguicidas y fertilizantes (Palma y Morales, 2011).



**Figura 5.** Cuenca del Balsas, se muestran los principales sistemas de captación y los ríos más importantes de la cuenca por su caudal, que son los ríos Atoyac y Zahuapan (Tomada y modificada de Dale la Cara al Atoyac <http://www.dalelacara.org/observatorio/infografias>).

Para el presente estudio, se determinaron los parámetros de calidad de agua que se presentan en la Tabla 2, y se compararon con los valores permisibles establecidos por la Ley de Derechos, disposiciones aplicables en materia de aguas nacionales (2016). Como se puede observar, los parámetros determinados en las muestras de agua tomadas durante el tiempo del estudio en Tepetitla de Lardizábal se encuentran altamente contaminadas, con valores que rebasan por mucho los límites permisibles, y en el caso del oxígeno disuelto, se encuentra muy por debajo de lo establecido por la norma.

**Tabla 2.-** Calidad del agua en los municipios participantes en del proyecto.

Parámetro	San Juan Ixtenco	Tepetitla de Lardizábal	Límites permisibles*
DO (mg/L)	4-5	<b>0-2</b>	5 (valor mínimo)
DQO (mg/L)	Cercano a 0	<b>100 – 250</b>	200 (valor máximo) **
Sólidos disueltos (mg/L)	100-200	<b>250 – 4000</b>	No establecido
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	Cercano a 0	<b>&gt; 5</b>	0.06 (valor máximo)
Fosfatos (mg/L)	Cercano a 0	<b>&gt; 5</b>	0.05 (valor máximo)
Cromo (µg/L)	< 50	<b>40 - 150</b>	50 (valor máximo)
Níquel (mg/L)	Cercano a 0	<b>0 - 0.7</b>	0.6 (valor máximo)

Estas determinaciones se realizaron en un muestreo ambiental previo al desarrollo de la toma de muestras biológicas como parte del presente proyecto. Valores permisibles, tomados de \*Ley Federal de Derechos, disposiciones aplicables en materia de aguas nacionales (Uso III, protección a la vida acuática). \*\*Valor derogado en la nueva versión de las disposiciones, 2016. Modificado de: López *et al.*, 2018. DO: oxígeno disuelto, DQO: demanda química de oxígeno.

Estudios de monitoreo realizados por diversas dependencias, organizaciones e instituciones académicas demuestran la presencia de compuestos tóxicos en el afluente del río, clasificados como VOC, metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros (Tabla 3) (Navarro *et al.*, 2004; Saldaña y Gómez, 2006; CONAGUA, 2008; IMTA-CONAGUA 2008; Sandoval *et al.*, 2009; García-Nieto *et al.*, 2011; Arellano *et al.*, 2015; Méndez-Serrano *et al.*, 2017; López *et al.*, 2018), que por sus características representan un riesgo elevado a la salud de los pobladores de la zona.

En un estudio de Arellano *et al.* (2015), se evaluó la toxicidad en muestras de agua provenientes del río Atoyac, utilizando como modelo a embriones de *Danio rerio*, se encontró que las sustancias contenidas en las muestras de agua provocaron al menos el 50% de mortalidad en diluciones de hasta 1:900, además de causar efectos teratogénicos observables en el desarrollo de los embriones sobrevivientes, y que estos efectos persistían en diluciones de hasta 1: 61,000, lo que da una idea de la elevada toxicidad y riesgo potencial de los contaminantes en este caudal.

**Tabla 3.** Compuestos tóxicos presentes en el agua del río Atoyac (CONAGUA-SEMARNAT, 2011; Greenpeace, 2014) y afectaciones a órganos y sistemas. (Tomada y modificada de López *et al.*, 2018)

Compuesto	Ca	Nt	D.E.	Resp.	Ren.	Card.	Hep	Inm	Hem	Derm	Referencia
<b>Benceno</b>	+	+	+	+				+			EPA-IRIS monografía, 2012; Bolden <i>et al.</i> , 2015
<b>Cloruro de vinilo</b>	+	+	+	+			+	+		+	ATSDR
<b>Formaldehído</b>	+	+		+	+		+	+		+	ATSDR
<b>Pentaclorofenol</b>	+		+				+	+		+	ATSDR
<b>Tricloroetileno</b>	+	+	+				+	+		+	ATSDR, Chia <i>et al.</i> , 1997, Tachachartvanich <i>et al.</i> , 2018
<b>As</b>	+			+	+		+		+	+	ATSDR
<b>Ni</b>	+			+	+			+	+		ATSDR
<b>Cd</b>	+		+	+	+						ATSDR
<b>Cr VI</b>	+		+	+	+				+		ATSDR
<b>Tolueno</b>		+	+	+		+		+			ATSDR, Bolden <i>et al.</i> , 2015
<b>Hg</b>		+	+	+	+					+	ATSDR
<b>Pb</b>		+	+		+				+		ATSDR
<b>1,4-diclorobenceno</b>			+	+			+				Versonnen <i>et al.</i> , 2003
<b>Bis-2(etilexil)ftalato</b>			+				+				NIOSH
<b>Fenol</b>				+	+		+			+	ATSDR
<b>Xilenos</b>		+		+	+	+	+	+			ATSDR, Bolden <i>et al.</i> , 2015
<b>Anilina</b>									+	+	ATSDR
<b>Cloroformo</b>		+			+					+	ATSDR
<b>Etilbenceno</b>				+	+	+		+			ATSDR, Bolden <i>et al.</i> , 2015

Ca- cancerígeno, Nt- neurotóxico, D.E.- disruptor endócrino, Resp.- afecta a las vías respiratorias, Card.- cardiotoxico, Hep- hepatotóxico, Inm- inmunotóxico, Hem- hematotóxico, Derm- dermatotóxico.

Organizaciones civiles de las comunidades afectadas han realizado registros de los casos diagnosticados de insuficiencia renal, púrpura trombocitopénica, anemia y leucemia en habitantes de las zonas (Navarro 2004; Palma y Morales 2011), debido a que las autoridades sanitarias de la zona negaron la existencia de un problema de salud hasta el año 2017. Por ello, para comprender la complejidad de la problemática, se han desarrollado investigaciones como la de Montero *et al.* en 2006, en la que se reportó que adultos de las comunidades cercanas al río Atoyac presentaron un daño genotóxico mayor que adultos de comunidades alejadas de él, y consideraron a las emanaciones de sustancias volátiles provenientes del río Atoyac como la fuente más probable de exposición en esta región, ya que el agua del efluente no es utilizada para consumo ni para actividades deportivas, ni recreativas, y otros factores como el tabaquismo y la exposición ocupacional no mostraron correlación con los resultados (Montero *et al.*, 2006). La CONAGUA, por su parte en una evaluación de riesgo ambiental determinó un perímetro de 2 km de distancia a partir del cauce del río como de mayor riesgo para los pobladores que se encuentran en esa zona (CONAGUA, 2008). En otro estudio, se utilizó un modelo en rata para mostrar los efectos que pueden provocar mezclas de VOC presentes en el río Atoyac, encontrando que la exposición repetida a mezclas de tolueno, cloroformo y diclorometano modifican la concentración y actividad de enzimas del complejo antioxidante como son CYP2E1, GSTT1, SOD y GRed; además, estos cambios corresponden con un incremento de peroxidación lipídica, y con un aumento en la cantidad de micronúcleos en médula ósea, por lo que se concluyó que la exposición a este tipo de mezclas conlleva a un incremento del estrés oxidante en los individuos expuestos y que esto genera daño a biomoléculas (Belmont *et al.*, 2014).

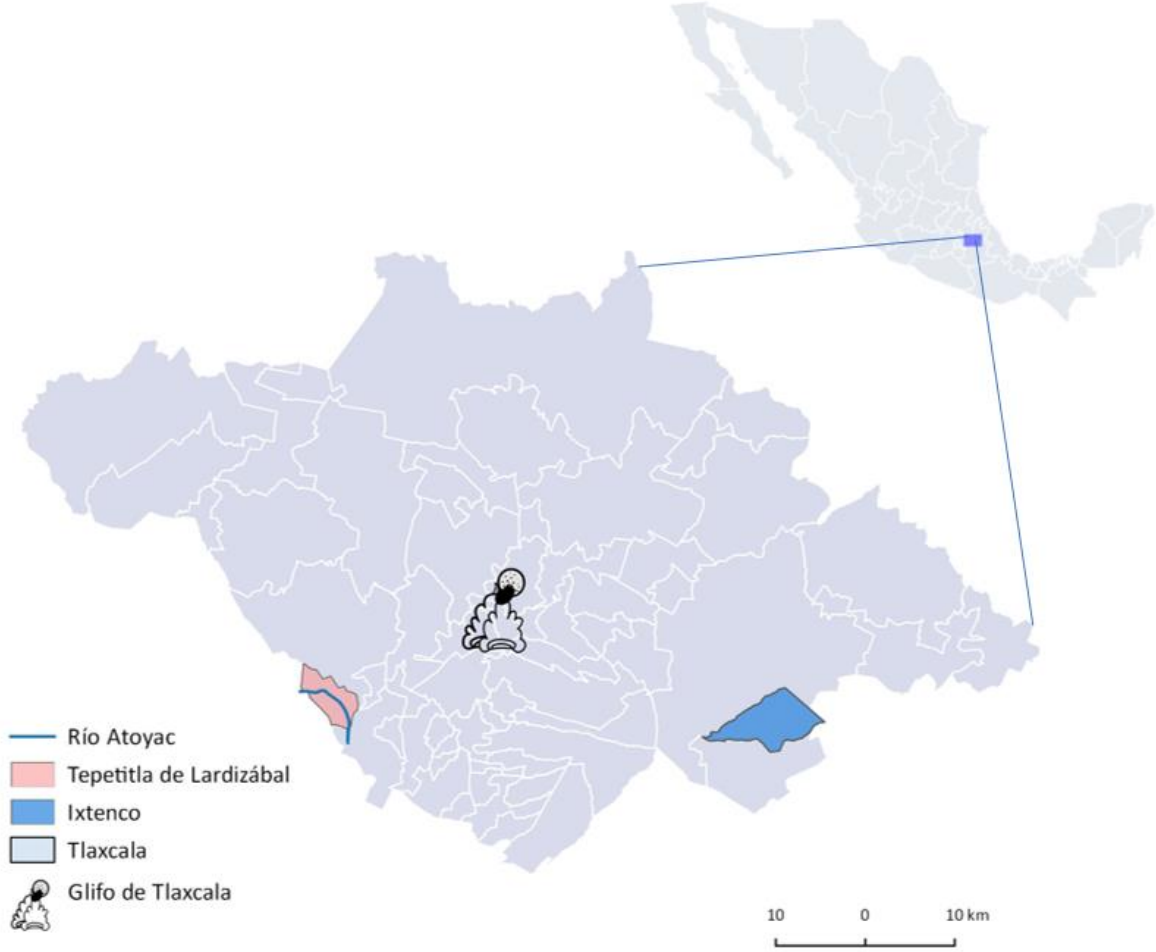
## **2.1 Establecimiento de la zona de estudio**

El río Atoyac es uno de los más contaminados del país, forma parte de la Cuenca Alta del Balsas, y se encuentra localizado entre los estados de Puebla y Tlaxcala. Se eligió trabajar en las comunidades de Villa Alta y San Mateo Ayecac como áreas de estudio cercanas al río Atoyac, estas se encuentran en el Municipio de Tepetitla de Lardizábal (Figura 6), Tlaxcala, comprenden una zona de transición agrícola-industrial, cuyas industrias más próximas son la petroquímica, la textil, de pinturas, de cerámicas, metalmecánica, la lavandería de mezclilla, entre otras.

Como área de referencia, alejada de fuentes industriales contaminantes y del río Atoyac a más de 20 km, fue la comunidad de San Juan Ixtenco, localizada en el municipio de Ixtenco (Figura 6), Tlaxcala.

En estos municipios se realizó un cuestionario validado por profesionales de sanidad presentado en el anexo II, a 350 padres o tutores de niños de las comunidades de las áreas de estudio. El cuestionario se utilizó para recopilar la información siguiente: nombre, dirección de la familia, sexo, edad, hábitos de alimentación, características del agua potable de su comunidad, estilo de vida, enfermedades en los padres y abuelos de los niños, tabaquismo pasivo y estado de salud de los niños; y en el caso de los habitantes de Tepetitla de Lardizábal se calculó la distancia

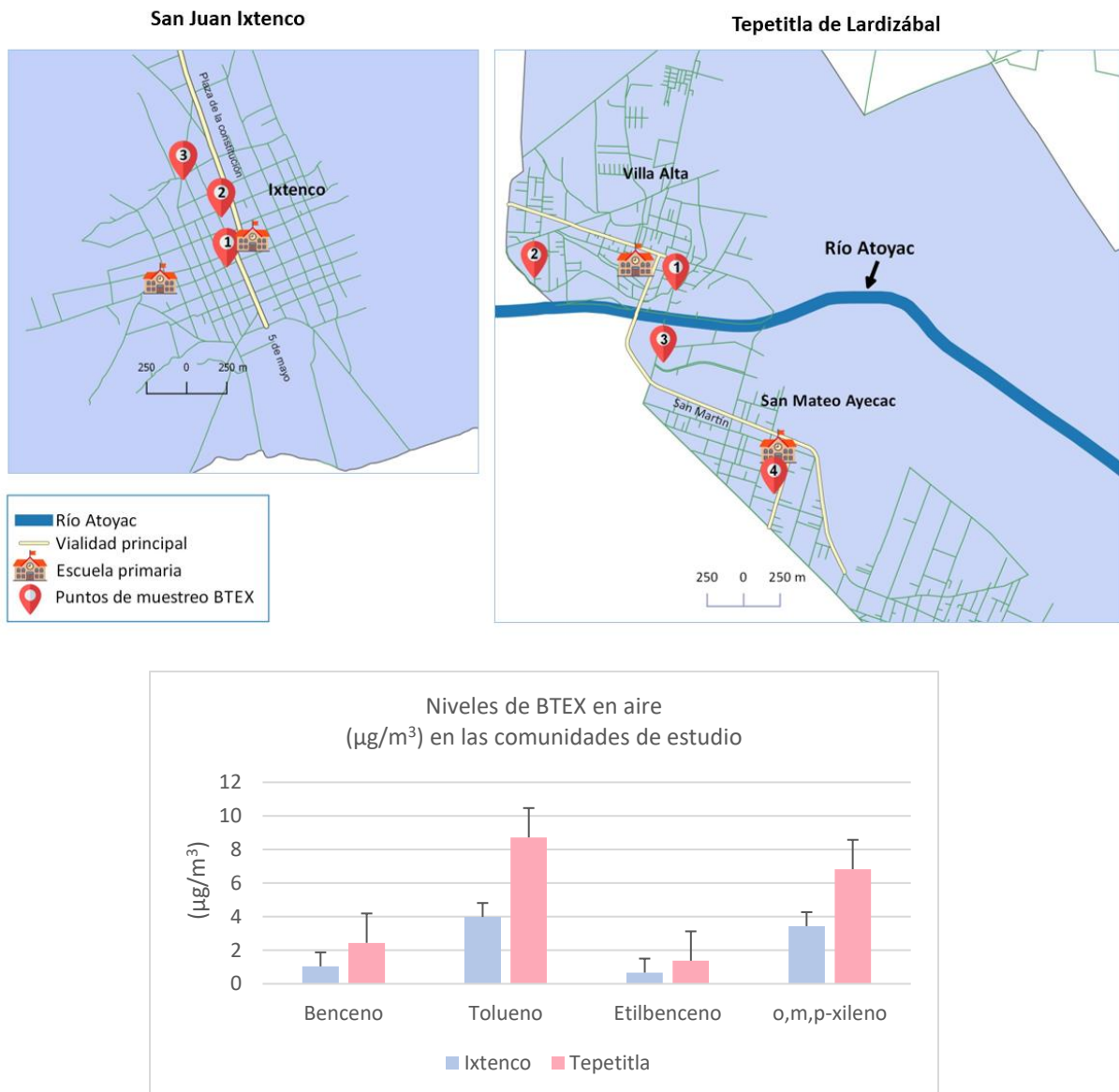
con el río Atoyac o canales adyacentes, (anexo III). En estas encuestas se determinó la percepción de los habitantes de Tepetitla de Lardizábal con relación a la situación de contaminación ambiental de su comunidad al describir olores, coloración y sabores “extraños” en el agua potable, así como olores característicos de compuestos químicos provenientes del río Atoyac y de los canales adyacentes. También se determinó que las viviendas del 56.7% de las familias entrevistadas, se encuentran en un rango de 100 a 500 metros del río Atoyac o de sus canales adyacentes, y el 10.5% está a menos de 100 metros, bastante cerca si se considera que la influencia de las emanaciones de contaminantes como los reportados en el Río Atoyac puede alcanzar una franja de 2 km, según lo establecido por CONAGUA (2008).



**Figura 6.-** Municipios de estudio localizados en el Estado de Tlaxcala (elaboración personal, con datos del INEGI 2011).

## 2.2 Determinación de BTEX en aire en las zonas de estudio

Debido a que la región se considera rural, no existe un programa de monitoreo del aire, de tal forma que para tener un estimación de los niveles de BTEX en el aire en las áreas de estudio, se colocaron muestreadores pasivos (Radiellos) en diferentes puntos, las localizaciones se especifican en la Figura 7, los muestreadores permanecieron en el sitio por un periodo de 7 a 10 días, después de los cuales fueron empaquetados para su transporte al Centro de Investigación Ambiental de Padua, Italia, donde se realizaron las determinaciones de los niveles de BTEX en aire en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , con cromatografía de gases acoplada a detector de flama (FID).



**Figura 7.-** Localización de comunidades de estudio y puntos de muestreo de BTEX (arriba). Promedio de concentraciones de BTEX en aire ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) por municipio (abajo).

### 3 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

En este proyecto de doctorado se propuso describir y comprender a partir de un estudio transversal la problemática específica en la población infantil (para eliminar el factor confusor de exposición ocupacional), en una de las regiones más contaminadas del país: el río Atoyac y canales de riego asociados, en las comunidades de Tepetitla de Lardizábal y San Mateo Ayecac, en Tlaxcala, México. Se exploró el efecto que pudieran tener los contaminantes, más específicamente los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC) benceno, tolueno, estireno y xilenos (BTEX), provenientes de las descargas industriales hacia el río Atoyac, en la **respuesta antioxidante** de niños de comunidades asentadas a las orillas del río, que han estado expuestos de por vida a estos compuestos, si esta respuesta pudiera verse modulada por la presencia de **polimorfismos** de bioactivación-desintoxicación de estos VOC, y si esto afectara la excreción de metabolitos de los BTEX, con el fin de demostrar que este ambiente afecta procesos fisiológicos importantes que pueden impactar a la salud.

### 4 HIPÓTESIS

La exposición ambiental a VOC en las comunidades adyacentes al río Atoyac produce una elevación en el Índice de Estrés Oxidante (OSI) en niños, relacionada con la biotransformación de estos compuestos y esta respuesta a su vez se asocia con los polimorfismos del metabolismo de VOC.

### 5 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la exposición crónica a VOC presentes en la zona por donde cruza el río Atoyac aumenta el estrés oxidante en niños de comunidades cercanas al río y si hay diferencias en la respuesta de este efecto en aquellos que tienen polimorfismos de riesgo que codifican enzimas de biotransformación de VOC, y comparar con una población infantil alejada del río.

#### 5.1 *Objetivos particulares*

1. Obtener **OSI** a partir de las concentraciones del Estado Total Oxidante (TOS) y la Capacidad Total Antioxidante (TAC) en muestras de plasma sanguíneo de niños de las comunidades de estudio.
2. Determinar la concentración de **metabolitos de VOC** seleccionados en muestras de orina de niños de Tepetitla de Lardizábal y de San Juan Ixtenco.
3. Identificar las frecuencias de los **polimorfismos** de *CYP2E1 RsaI*, *GSTT1 nulo*, *GSTM1 nulo* y *NQO1 C609T* en las muestras de sangre de los niños de las dos comunidades de estudio.

4. Establecer si existe relación entre el comportamiento del **OSI** con la cantidad de excreción de **metabolitos de VOC** en las muestras de orina de los niños de Tepetitla de Lardizábal y de San Juan Ixtenco.
5. Evaluar la relación entre el **OSI** y los **polimorfismos** metabólicos determinados en las muestras de los niños de las comunidades de estudio.
6. Determinar si existe correlación entre el **OSI**, los **metabolitos de los VOC** en orina y los **polimorfismos** de metabolismo, y si hay diferencias entre los resultados encontrados en las muestras biológicas de los niños de las comunidades de estudio.



## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Población de estudio

Con la información recabada en los cuestionarios (Anexo II y III) se eligieron a 91 niños en edad escolar (8-12 años, 44 niños y 47 niñas), cuyas viviendas se encuentran en las comunidades ubicadas dentro de una franja de 2 km de la ribera del río Atoyac (o de los canales que se desprenden de él), en el municipio de Tepetitla de Lardizábal; que fueron comparados contra un grupo de 93 niños (8-12 años, 48 niños y 45 niñas), de San Juan Ixtenco. Se obtuvo el consentimiento por escrito de los padres o tutores de los niños elegidos para participar en el estudio. El día anterior a la toma de muestra los niños se pesaron y midieron con un analizador de composición corporal InBody 230 (Biospace, Corea). Los criterios de exclusión fueron: niños fumadores pasivos, con enfermedades crónicas diagnosticadas o con enfermedades agudas al momento de la toma de muestra.

### 6.2 Muestras biológicas (sangre venosa y orina)

Se obtuvieron 93 y 91 muestras de sangre de los niños en condiciones de ayuno de San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal, respectivamente (tomadas por una enfermera pediatra). Se colectaron 3 mL de sangre venosa en 2 tubos Vacutainer heparinizados, y se almacenaron a 4°C. Un tubo de cada una de las muestras se transportó a un laboratorio clínico certificado en la Ciudad de México para realizar biometría hemática, y análisis generales y niveles de creatinina en orina, mientras que los segundos tubos se llevaron al laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental de la U.N.A.M. para la separación del plasma sanguíneo y las células. Las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos, y las fracciones separadas se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta el momento de los ensayos. También se obtuvieron muestras de orina, de la primera micción de la mañana de los niños de San Juan Ixtenco y de Tepetitla de Lardizábal, éstas se congelaron y almacenaron en tubos Sarstedt-Monovette para orina de 10 mL a -20°C.

### 6.3 Reactivos y equipos

#### 6.3.1 Reactivos

Tabla 4.- Reactivos empleados para las metodologías utilizadas en el desarrollo del proyecto.

MÉTODO	REACTIVO	CONCENTRACIÓN	MARCA	PUREZA	Grado
Estado Total Oxidante (TOS)	Cloruro sodio	140 mM	Sigma Aldrich	99.9%	Reactivo
	Ácido sulfúrico	25 mM	JT Baker	97.5%	Reactivo
	Glicerol	1.35 M	JT Baker	99.8%	Reactivo
	Naranja de xilenol	150 µM	Fluka	Espectrofotómetro	Reactivo
	Sulfato de amonio ferroso hexahidratado	5 mM	Sigma Aldrich	98%	Reactivo
	o-dianisidina dihidrocloruro	10 mM	Sigma Aldrich	99.9%	Reactivo

<b>Estado Total Oxidante (TOS) (cont.)</b>	Peróxido de hidrógeno	10 mM	JT Baker	30%	Reactivo
<b>Capacidad Total Antioxidante (TAC)</b>	Cloruro de potasio	75 mM	JT Baker	99.9%	Reactivo
	Ácido clorhídrico	75 mM		36.5%	Reactivo
	o-dianisidina dihidrocloruro	10 mM	Sigma Aldrich	99.9%	Reactivo
	Sulfato de amonio ferroso hexahidratado	45 µM	Sigma Aldrich	98%	Reactivo
	Peróxido de hidrógeno	7.5 mM	JT Baker	30%	Reactivo
	Trolox	10 mM	Sigma Aldrich	97%	Reactivo
<b>ácido fenil-mercaptúrico</b>	Ácido fenil mercaptúrico	25 µg/ L	TCI (Tokio Chemical Industries)	98%	Reactivo
	Ácido acético	0.5 %	Sigma Aldrich	99%	HPLC -masas-masas
	Acetonitrilo	10 %	Jt Baker	99%	HPLC -masas-masas
	Metanol	10 %	JT Baker	99%	HPLC-Masas
<b>o-cresol</b>	Acetona	concentrada	MEYER	99%	HPLC
	o-cresol	0.5 mg/L	Sigma Aldrich	99%	Reactivo
	Dietil éter	concentrado	Sigma Aldrich	99%	ACS
	Nitro benceno	300 mg/ml	Fermont	99.9%	ACS
	Sulfato de sodio anhidro	cristales	Fermont	99%	ACS
	Alcohol isopropílico	concentrado	Caledon	99.7%	HLPC
	Nitrógeno	-	Praxair	Ultra alta pureza	Cromatografía de gases
	Hidrógeno	-	Praxair	Ultra alta pureza	Cromatografía de gases
	Aire	-	Praxair	Extra seco	Cromatografía de gases
	Helio	-	Praxair	Ultra alta pureza	Cromatografía de gases
	Ácido clorhídrico	Concentrado	Fermont	Concentrado	Reactivo
<b>ácido hipúrico, ácidos o-m- y p-metil hipúricos, ácido</b>	Ácido hipúrico	10 µg/ mL	Sigma Aldrich	98%	Reactivo
	Ácido 2-metil hipúrico (orto)	3 µg/ mL	Sigma Aldrich	98%	Reactivo
	Ácido 3-metil hipúrico (meta)	6 µg/ mL	Sigma Aldrich	98%	Reactivo

<b>fenilglicólico y ácido mandélico</b>	Ácido 4-metil hipúrico (para)	4 µg/ mL	Sigma Aldrich	98%	Reactivo
	Ácido fenilglicólico	2 µg/ mL	Fluka	98 %	Reactivo
	Ácido mandélico	10 µg/ mL	Sigma-Aldrich	98%	Reactivo
	Acetato de etilo	4 mL/5 mL	Fermont	99.20%	Reactivo
	Cloruro de sodio	0.3 g/ mL	Fermont	99%	Reactivo
	Ácido clorhídrico	80 µL / mL	Fermont	Concentrado	Reactivo
	Acetonitrilo	100 mL/L	JT Baker	99%	HPLC
	Ácido acético	250 mL/ L	JT Baker	99%	HPLC
<b>PCR</b>	Taq polimerasa	2.6 U	Invitrogen	alta pureza	PCR
	Cloruro de magnesio	2 mM	Invitrogen	alta pureza	PCR
	Oligonucleótidos	0.2 µM	Invitrogen	alta pureza	PCR
	dNTPs	1.6 mM	Invitrogen	alta pureza	PCR
	Midori green	1 µL	Nippon gen		Electroforesis
	Marcador de 100 pb	1 U	Invitrogen	alta pureza	Electroforesis
	Marcador de 50 pb	1 U	Invitrogen	alta pureza	Electroforesis
	Agarosa	1% y 3%	Bio Rad	alta pureza	Electroforesis
	Enzima de restricción <i>RsaI</i>	1 U	New England Biolabs	alta pureza	-
	Amortiguador de reacción REact (NEB)	1 U	New England Biolabs	alta pureza	-
	Agua destilada, estéril libre de RNAsas y DNAsas	-	GIBCO BRL	alta pureza	PCR
	Enzima de restricción HinfI	1 U	New England Biolabs	alta pureza	-
	Amortiguador de reacción NEBuffer2	1 U	New England Biolabs	alta pureza	-

### 6.3.2 Equipos

**Tabla 5.-** Equipos empleados para las metodologías utilizadas en el desarrollo del proyecto.

<b>Método</b>	<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
<b>TOS y TAC</b>	Espectrofotómetro con temperatura controlada y lector de microplacas	BioTek	Synergy H4 Hybrid Multi-mode
<b>Ácido fenilmercaptúrico</b>	HPLC Líquidos-Masas-Masas	Thermo scientific	Finnigan Surveyor Lc Pump Plus
	Masas-Masas	Thermo scientific	TSQ QUATUM Acces Max
	Auto-muestreador	Thermo scientific	Finnigan Surveyor
	Columna	Hypersil Gold	Tamaño de partícula 3,0µm. 50mm de largoX4mm de diámetro interno
<b>o-cresol</b>	Cromatógrafo de gases Detector FID	Agilent technologies	789A 6C System
	Detector de masas	Agilent technologies	5975C inert MSD
	Auto-muestreador	Agilent technologies	7693
	Columna Cromatográfica	Agilent & JW GC Columns	Fenil-metil-siloxano al 5% para utilizarse en separación de hidrocarburos medianamente polares.
<b>Ácido hipúrico, ácidos o, m y p-metilhipúricos, ácido fenilglicólico y ácido mandélico</b>	HPLC-Arreglo de diodos	Agilent technologies	1200 Series
	Columna	Thermo Electron	ODS Hypersil 250mmX4.6 mm. Tamaño de partícula de 5µ
<b>PCR</b>	Termociclador	Eppendorf	Mastercycler Gradient
	Cámara de electroforesis	BIO-RAD	Mini Sub Cell GT
	Fuente de poder p/electroforesis	BIO-RAD	Power Basic Pac
	Transiluminador UV	BIO-RAD	UV Transiluminator 2000

## 6.4 Estado total oxidante (TOS)

El TOS fue determinado en plasma sanguíneo 24 horas después de su obtención por el método descrito por Erel (2005) con modificaciones, el cual se basa en la capacidad de las moléculas oxidantes presentes en la muestra, de oxidar un complejo de *o*-dianisidina / ión ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Tras la oxidación, el ión férrico ( $Fe^{3+}$ ) acoplado a *o*-dianisidina forma un complejo naranja-café con el indicador naranja de xilenol en medio ácido (Deiana *et al.*, 1999).

El método en microplaca consiste en agregar 35  $\mu$ L de muestra de plasma sanguíneo a 225  $\mu$ L de reactivo 1 (cloruro de sodio 140 mM, naranja de xilenol 150  $\mu$ L, glicerol 1.35 mM, en solución de ácido sulfúrico 25mM, pH 1.75) y realizar una primera lectura en espectrofotómetro a 560/800 nm, enseguida se agregan 11  $\mu$ L de reactivo 2 (*o*-dianisidina dihidrocloruro 10 mM, sulfato de amonio ferroso hexahidratado 5 mM, en solución de ácido sulfúrico 25mM, pH 1.75) y a los 5 minutos de iniciada la reacción, se hace una segunda lectura espectrofotométricamente a 560/800 nm, la intensidad de color se relaciona de manera positiva con la cantidad de oxidantes. La curva patrón se realiza con  $H_2O_2$  a las concentraciones 10, 50, 25, 10, 5 y 1  $\mu$ M, los resultados se expresan como micromoles de peróxido de hidrógeno equivalentes por litro ( $H_2O_2$   $\mu$ mol eqv./L). La contribución estimada al TOS de las moléculas componentes del plasma de acuerdo con Erel se presenta en la Tabla 6.

**Tabla 6.-** Moléculas oxidantes que forman parte de la composición del plasma sanguíneo y su contribución estimada en porcentaje al TOS.

Molécula oxidante en plasma	Contribución estimada en TOS (%)
Radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ )	} 0.1
Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	
Óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )	
Radicales alcoxi ( $RO^{\bullet}$ ) y peroxi ( $ROO^{\bullet}$ )	
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	
Ácidos grasos peroxidados	} 99.9
Peroxinitrito	
Disulfuros	
Aldehídos	
Quinonas	
Otros	

## 6.5 Capacidad Total Antioxidante (TAC)

La TAC se midió en plasma sanguíneo a las 24 horas posterior a la muestra por el método de Erel (2004), cuyo principio es similar al del ensayo de TOS. En este ensayo, una solución estandarizada del complejo *o*-dianisidina /Fe<sup>2+</sup>, se hace reaccionar con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5 mM vía reacción de Fenton, produciendo radicales hidroxilo (OH•). Los radicales oxidan las moléculas de *o*-dianisidina /Fe<sup>2+</sup> (incoloras) a radicales *o*-dianisidil/ Fe<sup>3+</sup> (color café) en un medio ácido. Los antioxidantes en la muestra previenen las reacciones de oxidación, impidiendo la formación del color.

El Método el microplaca consiste en adicionar 5 µL de muestra de plasma sanguíneo a 200 µL de reactivo 1 (*o*-dianisidina dihidrocloruro 10 mM, sulfato de amonio ferroso hexahidratado 45 mM, en solución Clark & Lubs: KCl 75 mM: HCl 75 mM relación 8:1, pH 1.8), se hace una lectura a 440 nm. A esta mezcla se agregan 10 µL de reactivo 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5 mM en solución de Clark & Lubs), esta reacción se mide a los 3:30 minutos de iniciada, en espectrofotómetro a 440 nm, la intensidad de color se relaciona de manera negativa con la cantidad de antioxidantes en la muestra. La curva patron se realiza con trolox (un análogo de la vitamina E) las concentraciones 1.4, 0.7, 0.35, 0.175, 0.088 mM (Prior *et al.*, 2005); los resultados se expresan como milimoles de trolox equivalentes por litro (trolox mmol eqv./ L). La contribución a TAC por cada una de las moléculas componentes del plasma de acuerdo con Erel, se presenta en la Tabla 7.

**Tabla 7.-** Moléculas antioxidantes que forman parte de la composición del plasma sanguíneo y su contribución estimada a la TAC, en porcentaje.

Molécula antioxidante en plasma	Contribución estimada a TAC (%)
Grupos tioles totales (-SH)	48.89
Vitamina C	5.00
Ácido úrico	3.83
Vitamina E	1.88
Bilirrubina	1.69
Otros	38.71

## 6.6 Índice de estrés oxidante (OSI)

Para determinar el OSI de cada muestra, se obtiene la razón entre TOS y TAC, y se multiplica por 100, con base en la siguiente fórmula:  $OSI = [(TOS \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eqv./L}) / (TAC \mu\text{mol trolox eqv./L})] \times 100$ . OSI se presenta como un parámetro de estrés oxidante con unidades arbitrarias, y es un indicador de la respuesta oxidante en el organismo.

Para las determinaciones de estos parámetros, en todos los casos se trabajó con muestras de plasma mantenidas en refrigeración, obtenidas 24 horas antes.

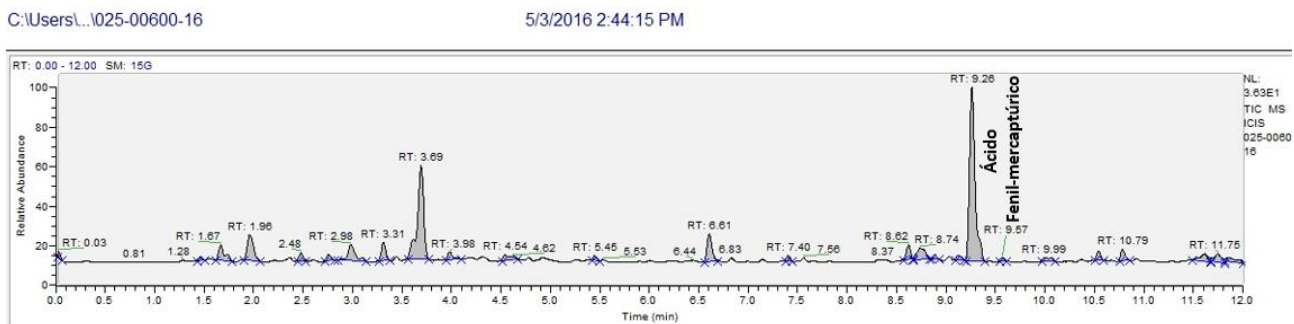
## 6.7 Determinación de metabolitos de BTEX en orina

Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Toxicología Industrial, del Hospital General de Nanchital de PEMEX. Previamente se cuantificaron los niveles de creatinina en una alícuota de 2 mL de orina para ajustar los resultados de las concentraciones de las muestras. Para todas las determinaciones se realizaron curvas de calibración con soluciones patrón de los 7 estándares (*o*-cresol, ac. fenilmercaptúrico, ác. metilhipúricos (orto-, meta-, para-), ác. fenilgloxílico o ác. mandélico), que también se utilizaron para establecer el límite de detección del analito (ld); para obtener el límite de cuantificación (lc) del analito se preparó una solución de orina adicionada con los estándares y se cuantificó de igual forma que las muestras.

### 6.7.1 Ac. fenilmercaptúrico

El ác. fenilmercaptúrico es el metabolito bioindicador validado de la exposición al benceno. Para la preparación analítica de las muestras de orina y su cuantificación se utilizó el método NIOSH 8326.

Extracción: 100  $\mu$ L de muestra se diluyen con 900  $\mu$ L de una solución de agua-acetonitrilo-ácido acético (90:10/0.5%), grado HPLC-MS-MS, se agita en vórtex durante 1 minuto y se transfieren 200  $\mu$ L a un microvial. Análisis: se inyectan 10  $\mu$ L de la solución contenida en el vial con un muestreador en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a espectrómetro de masas API de triple cuadrupolo. La identificación se basa en el modo de separación isocrático en una columna Hypersil Gold de 50 mm de longitud, 4 mm de diámetro y 3  $\mu$ m de tamaño de partícula, con temperatura de la columna a 30°C; y temperatura del vaporizador de 300°C. La masa molecular del ác. fenilmercaptúrico es de 238.7. La LD fue de 1  $\mu$ g/L y la LC de 25  $\mu$ g/L de ácido fenilmercaptúrico. El cromatograma obtenido es como el que se presenta en la Figura 8. La concentración del analito se calculó realizando un ajuste con la concentración de creatinina, el BEI del ácido fenilmercaptúrico es de 25  $\mu$ g/ g de creatinina.

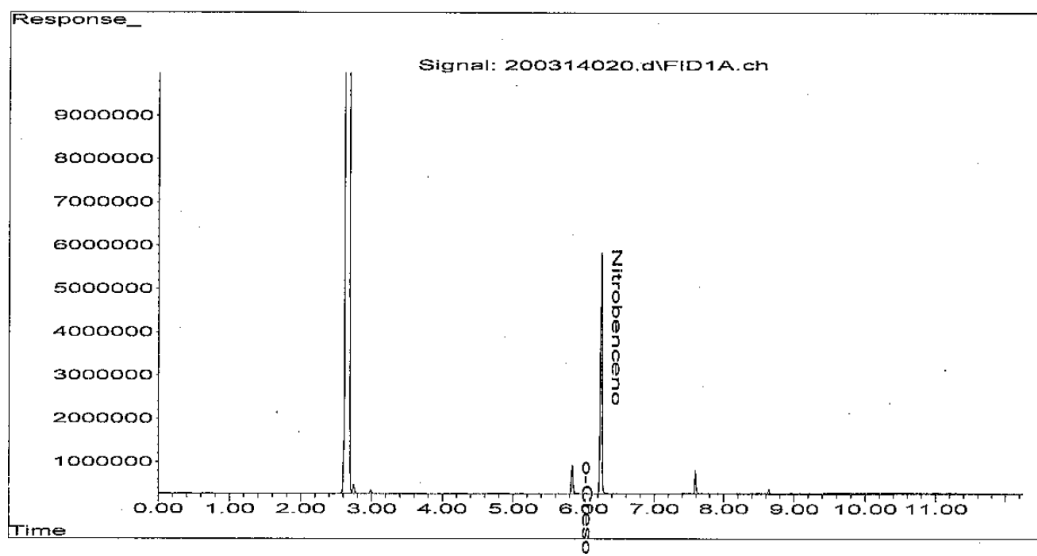


**Figura 8.-** Cromatograma de una muestra de orina para determinación de ácido fenilmercaptúrico. Se señala el pico de ácido fenilmercaptúrico en una de las muestras del estudio.

### 6.7.2 *o*-cresol

El *o*-cresol es uno de los metabolitos de la exposición al tolueno. La preparación analítica de las muestras de orina y su cuantificación se realizó siguiendo el método NIOSH 8305 con modificaciones.

Extracción: a 1 mL de muestra adicionar 1 mL de HCl concentrado y calentar a baño maría a 95°C durante 90 minutos; enfriar con agua y ajustar el volumen a 10 mL con agua grado HPLC, y adicionar 10 µL de nitrobenzeno (300 mg/ml) como estándar interno. Separación de fases: adicionar y mezclar 2 mL de éter dietílico, transferir el tubo a congelador a -15°C hasta la separación de las fases (1 hora aproximadamente); transferir la fase etérea a un vial ámbar de 2 mL y añadir cristales de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Análisis: las muestras se analizan en cromatógrafo de gases (CG) acoplado a detector de ionización de flama (FID), con columna capilar con recubrimiento interno de fenil-metil-siloxano al 5%, que separa hidrocarburos medianamente polares, temperatura máxima de 325°C, 30 m de longitud nominal, y 1.0 mL/min como flujo inicial, el tiempo total de la corrida fue de 12.25 min. El inyector se trabajó en modo Split con temperatura inicial a 250°C, volumen de inyección 2 µL, flujo del split 50:1, se trabajó con helio. El detector se utilizó a 300°C con un flujo de hidrógeno de 40 m/min. La LD fue de 0.1 mg/L y la LC de 0.5 mg/L de *o*-cresol. Los cromatogramas obtenidos son como el que se muestra en la Figura 9. Las unidades de *o*-cresol se expresa en mg/L, la concentración del analito se calculó realizando un ajuste con la concentración de creatinina, con base en los límites especificados por la Conferencia Gubernamental Americana de Higienistas Ambientales (ACGIH), que ha fijado el índice biológico de exposición (BEI) de *o*-cresol en 0.3 mg/g de creatinina.

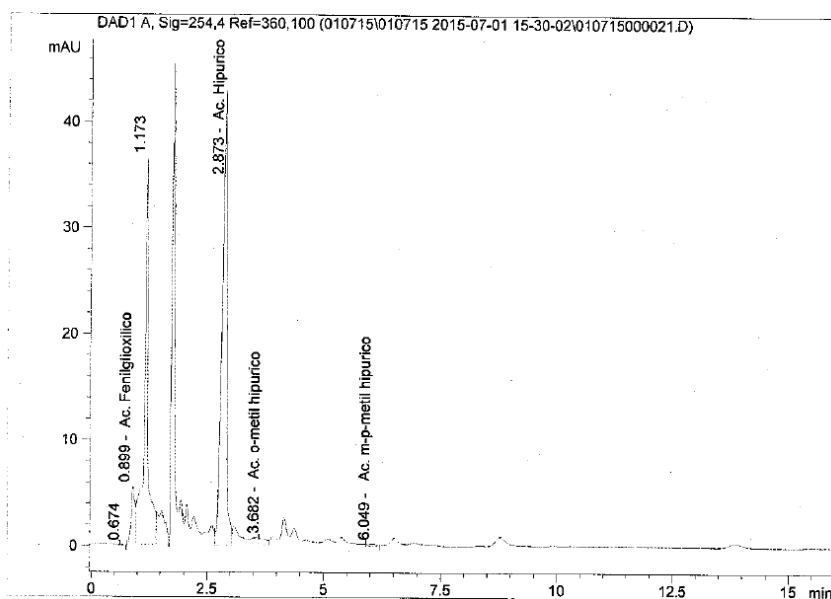


**Figura 9.-** Cromatograma de una muestra de orina para determinación de *o*-cresol. Se muestran picos de *o*-cresol (metabolito del tolueno) y de nitrobenzeno (estándar interno).



### 6.7.3 Ác. metilhipúricos (orto-, meta-, para-), ác. fenilgloxílico y ác. mandélico

Los ácidos metilhipúricos (*orto-*, *meta-*, *para-*) son metabolitos de la mezcla de xilenos, mientras que el ácido fenilgloxílico y el ácido mandélico, son metabolitos del etilbenceno. Para la preparación analítica de las muestras de orina y su cuantificación se utilizó el método NIOSH 8301 con modificaciones basadas en Ogata y Sugihara (1978). Extracción: se adicionan a 1 mL de muestra, 80  $\mu$ L de ácido clorhídrico y 0.3 g de cloruro de sodio en tubo de polipropileno, a esta mezcla se agrega 4 mL de acetato de etilo y se agita en vórtex, seguido de centrifugación; la fase orgánica se transfiere a un microvial y se evapora en baño maría a 77°C durante 55 min, el residuo se disuelve en 200  $\mu$ L de agua destilada para su cuantificación. Las muestras se eluyen con una mezcla de 900 mL de agua destilada (Grado 1), 100 mL de acetonitrilo (Grado HPLC) y 250  $\mu$ L de ácido acético glacial. Las muestras son transferidas a frascos ámbar para HPLC de 2 mL y se inyectan mediante muestreador en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con desgasificador y sistema de bombas cuaternarias. La identificación se basa en el modo de separación isocrático, en una columna ODS Hypersil C18 de 200mm de longitud, 4.6 mm de diámetro y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, con un flujo de 2mL/min, volumen de inyección de 20  $\mu$ L, temperatura de la columna de 30°C. Los tiempos de retención de los analitos, la LC y la LD para cada uno fueron: ác. *orto*-metilhipúrico 6.5 min, 1.2  $\mu$ g/mL y 3  $\mu$ g/mL, respectivamente; para los ácidos metil hipúricos (*para-* y *meta-*) 12 min, 2.4  $\mu$ g/mL y 6  $\mu$ g/mL; para el ác. fenilgloxílico 0.8 min, 0.8  $\mu$ g/mL y 2  $\mu$ g/mL; y del ác. mandélico 3.1 min 4  $\mu$ g/mL y 10  $\mu$ g/mL; tiempo total de la corrida cromatográfica 16 minutos. La Figura 10 corresponde a un cromatograma típico empleado en la determinación de estos analitos. Las unidades de calibración se dan en  $\mu$ g/mL, la concentración de cada analito se calculó realizando un ajuste con la concentración de creatinina, con base en los límites especificados por la ACGIH para los límites biológicos de exposición (BEI) que son: 1.5 g/g de creatinina para ác. metilhipúricos (*orto-*, *meta-* y *para-*) y 150 mg/g de creatinina para ác. fenilgloxílico y ác. mandélico.



**Figura 10.-** Cromatograma de una muestra de orina para determinación de ác.metilhipúricos (*orto-*, *meta-*, *para-*), ác. fenilgloxílico y el ác. mandélico. Se presentan picos de ác. fenilgloxílico, ác. hipúrico, y (*orto-*, *meta-*, *para-*) ac. metilhipúricos.

## 6.8 Extracción de DNA

Se utilizó un kit de sangre y tejidos DNeasy® (Qiagen group, Hilden, Alemania) para extraer DNA de cada muestra de sangre congelada. Se siguieron las instrucciones del método del fabricante, incluyendo el tratamiento con proteasas y RNAsas.

## 6.9 Polimorfismos estudiados

### 6.9.1 CYP2E1 RsaI

La amplificación y determinación del polimorfismo del gen CYP2E1 se hizo por PCR-RFLP de acuerdo con el método descrito por Hayashi *et al.* (1991). Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de 410 pb que presenta el sitio polimórfico para *RsaI*, fueron: el cebador “forward” 5’ – CCA GTC GAG TCT ACA TTG T – 3’; y el cebador “reverse” 5’ – TCC ATT CTG TCT TCT AAC T – 3’. Las reacciones de PCR se hicieron con el termociclador en tubos eppendorf con volumen final de 25 µL, conteniendo 5 µL de DNA aislado, Taq polimerasa 2.5 U, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, oligo 0.2 µM de cada uno, dNTP’s 1.6 mM y agua estéril. El programa fue de 30 ciclos, el paso de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, y ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, para finalizar 3 minutos de extensión a 72°C. Para corroborar la amplificación, se corrieron 5 µL del producto de reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con Midori Green. Para conocer la presencia del polimorfismo *RsaI*, se tomaron 10 µL del producto de reacción y se adicionaron 0.1 µL de la enzima de restricción *RsaI* (New England Biolabs), 1.5 µL de amortiguador de reacción REact® (NEB) y 3.4 µL de agua destilada, y se incubó por 24 horas a 37°C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 3% teñido con Midori Green, la presencia/ausencia del polimorfismo *RsaI* se determinó con el siguiente patrón de bandas: una banda de 360 pb y una de 50 pb fue indicativo del homocigoto nativo (*c1c1*); una banda de 410 pb, otra de 360 pb y otra de 50 pb fueron del heterocigoto (*c1c2*); una banda única de 410 pb fue el homocigoto mutante (*c2c2*) (Figura 11).

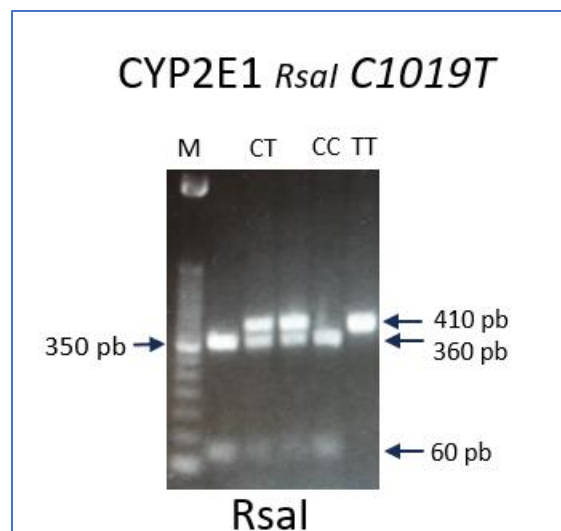


Figura 11.- Bandas en gel de agarosa al 3% de los genotipos del polimorfismo CYP2E1 *RsaI*.

### 6.9.2 NQO1 C609T

La amplificación y determinación del polimorfismo del gen NQO1 se realizó con PCR-FRLP basado en el método descrito por Eguchi-Ishimae *et al.* (2005), utilizando los oligonucleótidos: cebador “forward” 5’ – CCT CTC TGT GCT TTC TGT ATC – 3’; “reverse” 5’- GAT GGA CTT GCC CAA GTG ATG 3’, para amplificar un fragmento de 299 pb. Las reacciones se hicieron en tubos para PCR con un volumen final de 25  $\mu$ L con 4  $\mu$ L de DNA aislado, Taq polimerasa 2 U, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, oligonucleótidos 0.5  $\mu$ M de cada uno, dNTP’s 0.2 mM y agua estéril. La amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, y 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C, para finalizar 3 minutos de extensión a 72°C. Para corroborar la amplificación, se corrieron 5  $\mu$ L del producto de reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con Midori Green. Para conocer la presencia del polimorfismo NQO1 C609T, se tomaron 10  $\mu$ L del producto de reacción y se adicionaron 0.2  $\mu$ L de la enzima de restricción HinfI 1U, 1.5  $\mu$ L de amortiguador de reacción NEBuffer2® (de New England Biolabs) y 3.3  $\mu$ L de agua destilada, la digestión constó de 20 horas a 37°C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 3% teñido con Midori Green, la presencia/ausencia del polimorfismo C609T se determinó por el tipo de bandeo: una banda de 214 pb y otra de 85 pb fue indicativo del homocigoto nativo (CC); una banda de 214 pb, otra de 151 pb, otra de 85 y otra de 63 pb fueron del heterocigoto (CT); una banda de 151 pb, otra de 85 pb y otra de 63 pb determinaron el homocigoto mutante (TT) (Figura 12).

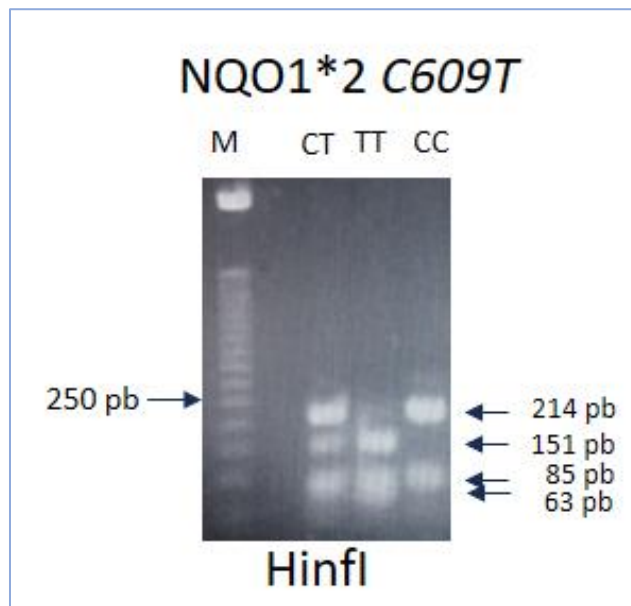
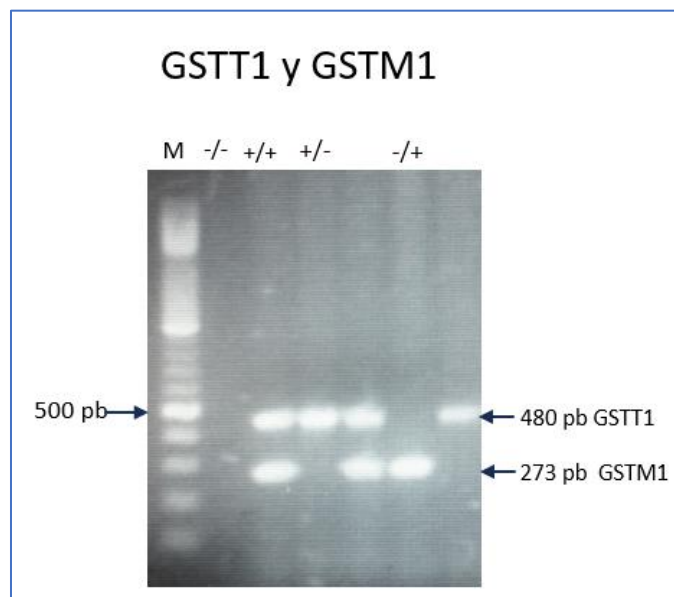


Figura 12.- Bandas en gel de agarosa al 3% de los genotipos del polimorfismo NQO1 C609T.

### 6.9.3 GSTT1 y GSTM1 nulos

La amplificación de los genotipos GSTT1 y GSTM1 se realizó por PCR múltiple siguiendo los métodos descritos por Hirvonen *et al.* (1993) y Pemble *et al.* (1994), respectivamente. Para GSTT1 el fragmento amplificado fue de 480 pb y los oligonucleótidos utilizados fueron: el cebador “forward” 5’ - TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC - 3’ y el cebador “reverse” 5’ - TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3’. Para GSTM1 se amplificó una secuencia de 273 pb con los oligonucleótidos: cebador “forward” 5’ - CTG CCC TAC TTG TTG ATT GAT GGG - 3’, y “reverse” 5’ - CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC - 3’. Las reacciones de PCR se hicieron en tubos para PCR con un volumen final de 25  $\mu$ L, cuyo contenido fueron 5  $\mu$ L de DNA aislado, 1 U de Taq polimerasa, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada oligo, 0.120 mM de dNTP’s y agua estéril. Las condiciones del programa: 94°C para desnaturalización por 2.5 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min para alineación y 72°C por 1 min, y un tiempo final de extensión de 9 min a 72°C. A 5  $\mu$ L del producto de reacción se le aplicó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Midori Green, para evidenciar la presencia o ausencia de los fragmentos amplificados (Figura 13). Los polimorfismos consisten en la delección total o parcial del gen, que se ve reflejada en ausencia del fragmento de amplificación, y dado que el polimorfismo nulo de GSTT1 tiene una frecuencia de 10% en la población mexicana (Montero *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008) se utilizó como testigo interno en las reacciones, además de DNA de un individuo que porta los dos genes nativos en cada sesión de amplificación. Las muestras que resultaron mutantes para ambos genes (nulos), se volvieron a amplificar utilizando el gen de la  $\beta$ -actina como control interno, con el que se obtenía un fragmento de 260 pb.



**Figura 13.-** Bandas de amplificación de GSTT1 y GSTM1.

## 6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas Stata 12 y GraphPad Prism 6. La prueba de Shapiro-Wilk fue utilizada para verificar normalidad. Las comparaciones estadísticas entre la TAC, el OSI y las concentraciones de metabolitos entre las muestras biológicas de niños de las comunidades en San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, dado que los datos no cumplían con el criterio de normalidad. La prueba para los datos de TOS con distribución normal fue *t* de student. Se normalizó la variable de interés OSI, transformando los valores a logaritmo natural, obteniendo la variable con distribución normal *lnOSI*. Se calculó el *Odds ratio* para el riesgo de presentar OSI alto en las muestras de plasma sanguíneo de los niños de Tepetitla de Lardizábal en comparación con las muestras del grupo de niños de San Juan Ixtenco, tomando los valores a partir del percentil 90 (P90) de la distribución del *lnOSI* en las muestras de San Juan Ixtenco como valores elevados.

Para evidenciar el componente de riesgo de exposición a una mezcla de BTEX, se estandarizaron las variables de concentración de metabolitos a partir de la construcción de un puntaje Z, para cada uno de los metabolitos determinados con respecto a la media, donde se expresa la distancia, en términos de desviaciones estándar, en que se encuentran las concentraciones de la muestra de un individuo. Se sumaron los puntajes Z para construir un puntaje general de concentración de metabolitos en cada muestra, denominando la variable como puntaje Z de metabolitos.

Con el fin de determinar cómo influyen las variantes alélicas de los polimorfismos estudiados en el OSI, se trabajó con un modelo de parsimonia con el operador de selección de Lasso que se basa en el criterio de verosimilitud del modelo, en el que se usaron los valores transformados por logaritmo natural (*lnOSI*), de los resultados encontrados para las muestras de los dos municipios del estudio. Se seleccionaron las variantes alélicas que se relacionaron con el comportamiento del *lnOSI* a través del criterio del estadístico Cp de *Mallows* más bajo, basado en el criterio de información de Akaike (AIC) (Bind *et al.*, 2014; Tibshirani, 1996). El análisis se hizo con el paquete de Regresión de Menor ángulo (Lars) en Stata 12. El análisis arroja una  $\beta$  que representa la importancia de la variable, mientras más elevada, mayor es la importancia en el comportamiento positivo del *lnOSI*, las  $\beta$  negativas se relacionan con un decremento en el *lnOSI*, mientras que las  $\beta=0$  se descartan ya que no representan modificación en el comportamiento del *lnOSI*.

Además de los polimorfismos como variables modificadoras del comportamiento del OSI en las muestras de los niños de Tepetitla de Lardizábal, otras variables podrían tener alguna contribución, para determinarlos, se utilizó un análisis bivariado con regresión lineal para cada una de las siguientes variables contra el *lnOSI*: edad, peso, talla, puntaje Z de metabolitos, CYP2E1 *RsaI c1c1*, CYP2E1 *RsaI c1c2*, CYP2E1 *RsaI c2c2*, NQO1 *C609T CC*, NQO1 *C609T CT*, NQO1 *C609T TT*, GSTT1 *nulo* y GSTT1 *presente*, GSTM1 *nulo* y GSTM1 *presente*, fumadores en el hogar, eritrocitos en orina, presencia de bacterias en la orina, el hematocrito, cercanía con canales o el río Atoyac a su hogar (en metros). Las variables que presentaron un valor de  $p \leq 0.2$  en el análisis bivariado, se seleccionaron para hacer un análisis con un modelo lineal generalizado (GLM) explicativo del comportamiento de la variable *lnOSI*, y éstas fueron: edad, cercanía con el río Atoyac o canales (en metros), el puntaje Z de metabolitos y NQO1 *C609T CC*, CYP2E1 *RsaI c2c2* y GSTT1 *presente*. Para el modelo explicativo de la variable *lnOSI* se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo para las

variables involucradas. Este modelo se aplicó a los datos obtenidos en la comunidad de San Juan Ixtenco, para evidenciar diferencias entre lo encontrado en la comunidad de Tepetitla de Lardizábal.

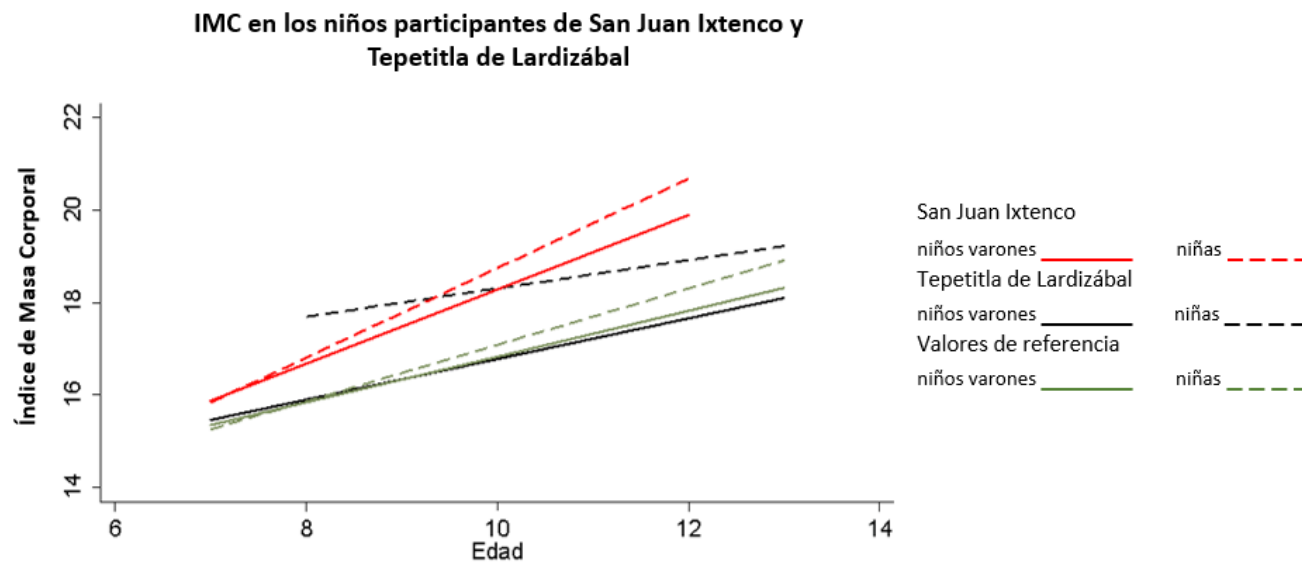
## 7 RESULTADOS

### 7.1 Datos antropométricos y sociodemográficos.

Las comunidades San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal son comparables en cuanto datos de grado de marginación, tipo de población y tipo de alimentación (Tabla 8). Sin embargo, los datos de Índice de Masa Corporal (IMC) en los niños varones y las niñas estudiados de San Juan Ixtenco y en las niñas de Tepetitla de Lardizábal muestran una tendencia al sobrepeso, ya que su IMC es superior a lo asignado para sus edades (Figura 14) de acuerdo con el III Proyecto de Asistencia Técnica para la Comida y Nutrición (FANTA por sus siglas en inglés), mientras que el 9% de los niños varones de Tepetitla de Lardizábal mostraron una tendencia de bajo peso para lo asignado a sus edades (FANTA, 2012).

**Tabla 8.-** Datos antropométricos y sociodemográficos de las poblaciones de estudio.

Datos antropométricos y sociodemográficos	San Juan Ixtenco	Tepetitla de Lardizábal
No. de muestras	93	91
Edad (años)	9.6 ± 1.35	10.4 ± 1.36
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18.08 ± 3.17	17.71 ± 2.74
Peso (Kg)	34.51 ± 9.11	36.12 ± 7.99
Talla (cm)	137.28 ± 8.9	142.07 ± 9.34
Niños: niñas (%)	52:48	48:52
Grado de marginación (CONAPO 2010)	Medio	Medio
Población	Mestiza	Mestiza
Tipo de alimentación	Mixta (Variada)	Mixta (Variada)
Distancia al río Atoyac o canales (m)	-	529.13

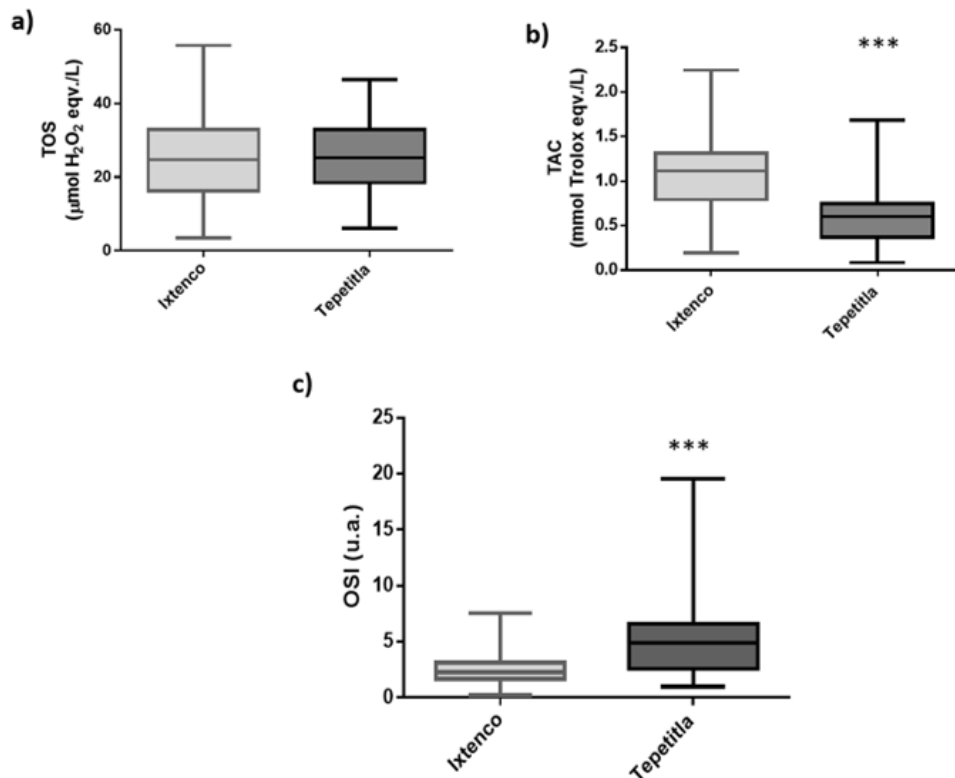


**Figura 14.** Desarrollo de los niños en las comunidades de estudio de acuerdo con su Índice de Masa Corporal (IMC). La tendencia al sobrepeso es notable entre las niñas de Tepetitla de Lardizábal (línea negra interrumpida) así como en los niños varones y en las niñas de San Juan Ixtenco (líneas rojas). Los niños varones de Tepetitla de Lardizábal muestran una tendencia a un IMC por debajo de lo asignado para niños varones de su edad, sin embargo, se mantienen dentro del límite (línea negra continua). Las líneas verdes representan los valores de referencia normales, de acuerdo con el proyecto FANTA (2012).

## 7.2 TOS, TAC y OSI.

En la Tabla 9 se muestran los resultados de los parámetros de estrés oxidante, en la Figura 15a se observa la distribución del TOS en  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ eqv./L}$ , en la distribución no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos (mediana San Juan Ixtenco= 24.9 y mediana de Tepetitla de Lardizábal = 25.3,  $p= 0.26$ , 95% de I.C.). Mientras que la distribución de la TAC en  $\text{mmoles de Trolox eqv./L}$  en el grupo de niños de Tepetitla de Lardizábal (mediana = 0.62) es significativamente diferente que en los niños de San Juan Ixtenco (mediana = 1.1)  $p= 0.0001$  y 95% de I.C. (Figura 15b). En el caso del OSI (unidades arbitrarias) se encontró una distribución diferente, con valores significativamente más elevados en las muestras de los niños de la comunidad de Tepetitla de Lardizábal (mediana = 4.91) en comparación con lo encontrado en las muestras de los niños de San Juan Ixtenco (mediana = 2.28) (Figura 15c),  $p= 0.0001$  con un 95% I.C.

El *Odds ratio* en los niños de Tepetitla de Lardizábal fue de 8.86, lo que significa que los niños de Tepetitla de Lardizábal tienen un riesgo mayor de presentar OSI elevado en comparación con los niños de San Juan Ixtenco, tomando como factor de riesgo vivir en una comunidad con un ambiente contaminado.



**Figura 15.-** Distribución en rangos intercuantiles de los parámetros de estrés oxidante de las muestras de plasma de niños de las comunidades de estudio: San Juan Ixtenco (n=93) y Tepetitla de Lardizábal (n=91). a) Estado Total Oxidante (mediana=24.9, media= 24.9 ± 10.7); b) Capacidad Total Antioxidante (mediana=1.10, media= 1.12 ± 0.42); c) Índice de Estrés Oxidante (mediana= 2.3, media= 2.6 ± 1.5).



**Tabla 9.-** Parámetros de estrés oxidante medidos en plasma sanguíneo, y niveles de metabolitos en orina en las muestras de las comunidades de estudio.

Población	TOS (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol eqv./L)		TAC (Trolox mmol eqv/L)		OSI (U.A) **		Ácido s-fenilmercaptúrico (g/g de creatinina)		o-cresol (mg/g de creatinina)		Ácido metilhipúrico (g/g de creatinina)		Ácido fenilgloxílico y ácido mandélico (mg/g de creatinina)	
	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp
Media ± DS	24.9 ± 10.7	25.9 ± 9.4	1.1 ± 0.42	0.65 ± 0.33	2.6 ± 1.5	5.2 ± 3.4	9.7 ± 25.3	6.1 ± 12.8	0.08 ± 0.15	0.16 ± 0.25	0.16 ± 0.11	0.13 ± 0.09	135 ± 153.7	37.5 ± 122.8
Mediana	24.9	25.3	1.1	0.62	2.3	4.9	0	0	0	0	0.14	0.04	75.2	7.9
Percentiles (p25, p75)	16.27, 32.88	18.42, 32.9	0.8, 1.33	0.39, 0.77	1.67, 3.11	2.6, 6.57	0, 19.79	0, 27.26	0, 0.11	0, 0.23	0.093, 0.226	0, 0.018	14.87, 154.93	0, 20.68
Min	3.5	6.1	0.20	0.11	0.21	0.96	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	55.7	46.5	2.3	1.7	7.5	19.6	160.4	57.6	0.47	1.1	0.49	0.80	700.4	809.3
p	0.2597		0.0001*		0.0001*		0.177		0.0301*		0.0001*		0.0001*	

\*Valores diferentes significativamente entre las dos comunidades. \*\* Unidades Arbitrarias.

TOS= Estado Oxidante Total, TAC= Capacidad Total Antioxidante, OSI= Índice de Estrés Oxidante. Ix- San Juan Ixtenco (n=93), Tp- Tepetitla de Lardizábal (n=91). Los valores por debajo del límite de detección fueron sustituidos por el valor 0.

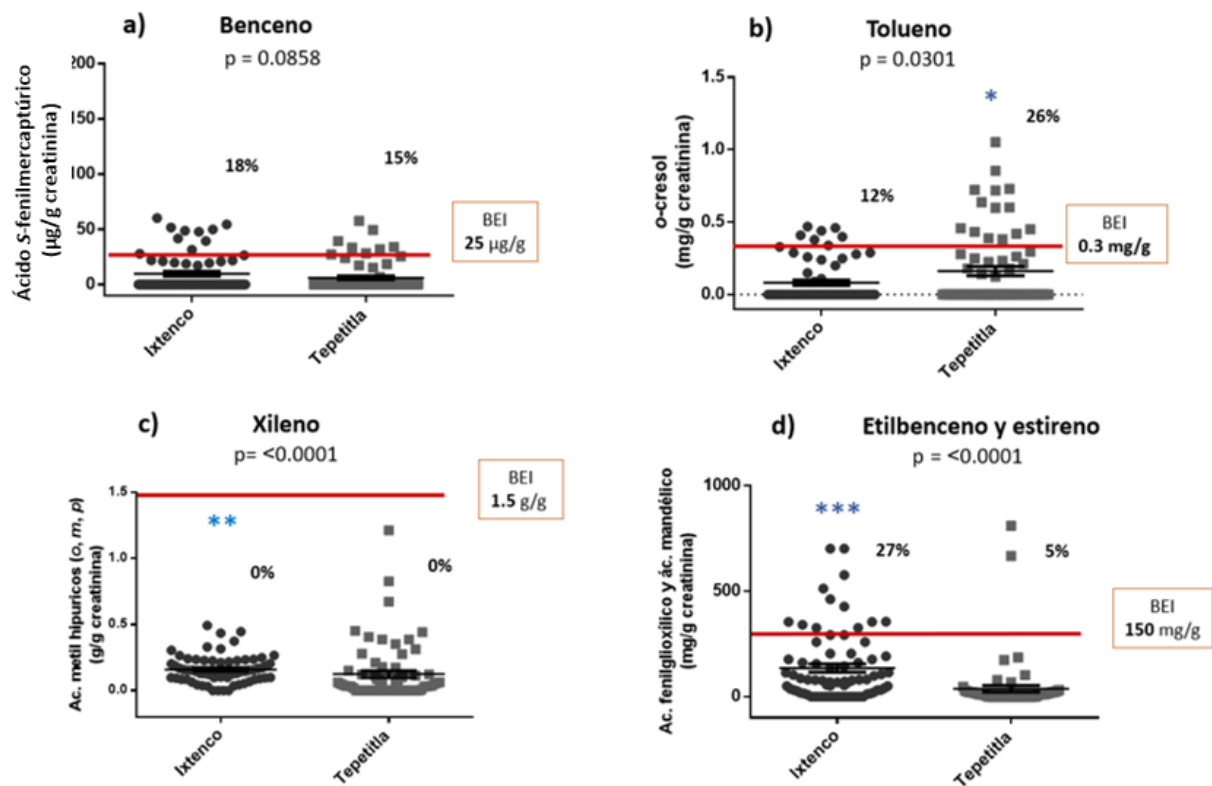
### **7.3 Metabolitos de BTEX en orina.**

En la Tabla 9 se muestran las medidas de tendencia central, así como los intervalos encontradas en las muestras de orina de los niños estudiados en San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal para los metabolitos de BTEX, las muestras que se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica fueron incluidos para su análisis con valores de cero. En la Figura 16 se muestran las distribuciones de las concentraciones para los metabolitos encontrados en las comunidades del estudio y se especifican los valores del Límite Biológico de Exposición (BEI) dados por la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH) para cada uno. En las distribuciones de las concentraciones de microgramos de ácido fenilmercaptúrico por gramo de creatinina no hay diferencia significativa entre ambos grupos (San Juan Ixtenco  $9.7 \pm 25.3$  y Tepetitla de Lardizábal  $6.1 \pm 12.8$ ,  $p=0.17$ ), aunque sí se encontró que el 18% y 15% de las muestras de orina en San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal respectivamente, mostraron concentraciones que sobrepasan el BEI (Figura 16a).

Las concentraciones en miligramos de *o*-cresol por gramo de creatinina en Tepetitla de Lardizábal ( $0.16 \pm 0.25$ ) fueron más altas que en San Juan Ixtenco ( $0.08 \pm 0.15$ ), y se distribuyeron en forma significativamente diferente ( $p=0.03$ ); en Tepetitla de Lardizábal el 26% de las muestras presentaron concentraciones por arriba del BEI, en San Juan Ixtenco, el 12% (Figura 16b).

Las concentraciones de ácidos metilhipúricos, en gramos por gramo de creatinina, presentan distribuciones significativamente diferentes entre ambos grupos ( $p= 0.0001$ ) siendo más elevadas en San Juan Ixtenco ( $0.16 \pm 0.11$ ) que en Tepetitla de Lardizábal ( $0.13 \pm 0.09$ ), aunque ninguna de las muestras rebasó el BEI (Figura 16c).

Por último, las concentraciones de ácido fenilgloxílico y de ácido mandélico, en miligramos por gramo de creatinina, muestran diferencias significativas ( $p= 0.0001$ ) entre las poblaciones, los valores encontrados en San Juan Ixtenco ( $135 \pm 153.7$ ) son más elevados que los de Tepetitla de Lardizábal ( $37.5 \pm 122.8$ ), las concentraciones se encontraron por encima del BEI en 5% de las muestras en Tepetitla de Lardizábal y 27% en San Juan Ixtenco (Figura 16d).



**Figura 16.-** Distribución de las concentraciones de los metabolitos de BTEX en las muestras de orina de niños de las comunidades de estudio San Juan Ixtenco ( $n=93$ ) y Tepetitla de Lardizábal ( $n=91$ ), se especifica el Índice Biológico de Exposición (BEI) basado en los lineamientos de la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH 2015) para cada metabolito, y el porcentaje de muestras por encima de este BEI por comunidad.

#### 7.4 Polimorfismos de CYP2E1, NQO1, GSTT1 y GSTM1

Las frecuencias encontradas de los polimorfismos se presentan en la Tabla 10. La frecuencia del polimorfismo mutante CYP2E1 *RsaI* (*c2*) fue de 0.23 y 0.27 en las muestras de sangre de los niños estudiados en San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal respectivamente, y no son estadísticamente distintos,  $p= 0.28$ ; el alelo silvestre de NQO1 *C609T* (*C*) tiene una frecuencia de 0.46 en las muestras de San Juan Ixtenco y de 0.53 en las muestras de Tepetitla de Lardizábal, y tampoco son diferentes,  $p= 0.19$ ; para GSTT1 *presente* las frecuencias en las muestras de sangre fueron 0.89 en San Juan Ixtenco y 0.93 en Tepetitla de Lardizábal,  $p= 0.41$ ; el genotipo *nulo* de GSTM1 en las muestras de San Juan Ixtenco fue encontrado en una frecuencia de 0.35 y de 0.4 en Tepetitla de Lardizábal, también estadísticamente iguales,  $p= 0.57$ . Por lo tanto, ambas poblaciones fueron genotípicamente similares.

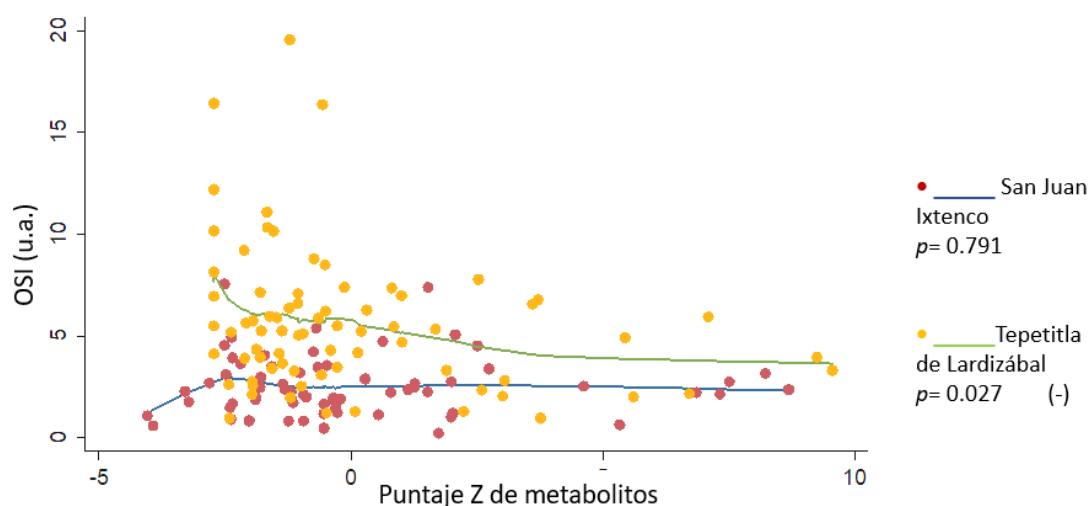
**Tabla 10.-** Frecuencia de alelos o genotipos y su correspondiente polimorfismo estudiado.

Polimorfismo	Frecuencia en San Juan Ixtenco	Frecuencia en Tepetitla de Lardizábal	<i>p</i>
CYP2E1 <i>RsaI</i> alelo <i>c2</i>	0.23	0.27	0.28
NQO1 <i>C609T</i> alelo <i>C</i>	0.46	0.53	0.19
GSTT1 genotipo <i>presente</i>	0.89	0.93	0.41
GSTM1 genotipo <i>nulo</i>	0.35	0.40	0.57

#### 7.5 Puntaje Z de metabolitos de BTEX en orina.

Este puntaje se asignó para estandarizar la concentración de metabolitos, ya que inicialmente están dadas en unidades de medida diferentes, la estandarización Z permite tomar un conjunto de datos y determinar cuántas  $\pm$  desviaciones estándar se encuentran los datos de la media, de esta forma pueden ser comparables entre sí y sumarse para tener una sola variable. Los puntajes Z de metabolitos entre ambas poblaciones no presentaron diferencias significativas teniendo una  $p= 0.78$  en la prueba estadística. Con los puntajes Z de metabolitos se hizo una prueba de regresión lineal contra el InOSI para los resultados de cada comunidad, y se encontró una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre el aumento de InOSI y el puntaje Z de metabolitos ( $p= 0.027$ ) en las muestras de niños de Tepetitla de Lardizábal, mientras que para las muestras de San Juan Ixtenco no se encontró correlación entre estas variables ( $p= 0.791$ ) (Figura 17).

### InOSI vs puntaje Z de metabolitos



**Figura 17.-** Distribución de los datos de las variables InOSI y puntaje Z de metabolitos para las muestras biológicas de los niños de las comunidades de estudio.

#### 7.6 Selección de Lasso.

En la selección de Lasso, que se utilizó para determinar la influencia de las variantes alélicas de los polimorfismos estudiados en las muestras biológicas de las comunidades de estudio sobre el comportamiento de la variable InOSI (variable construida a partir de la variable Índice de Estrés Oxidante normalizada con logaritmo natural), únicamente hubo relaciones entre alelos o genotipos con InOSI para los niños de Tepetitla de Lardizábal, en las muestras de los niños de San Juan Ixtenco no existieron correlaciones. Se observó una correlación entre el incremento del InOSI y CYP2E1 *RsaI*, NQO1 *C609T* y GSTT1, particularmente en los siguientes genotipos: CYP2E1 *RsaI* (*c2c2*) y NQO1 *C609T* (CC) con una  $\beta$  de 1.3047 y 0.7687 respectivamente, y GSTT1 *presente* con una  $\beta$  de 1.2328 (Tabla 11). El genotipo CYP2E1 *RsaI* (*c2c2*) es el que presentó mayor peso en esta prueba y por lo tanto sería el que conferiría mayor riesgo de presentar un InOSI elevado.

**Tabla 11.-** Resultados de la selección de Lasso para las variables polimórficas que correlacionaron con InOSI.

Alelos o genotipo	CYP2E1 <i>RsaI</i> ( <i>c2c2</i> )	NQO1 (CC)	GSTT1 <i>presente</i>
$\beta$	1.3047	0.7687	1.2328
Coeficiente de Cp	0.4830	0.1714	0.5208
			Cp= 1.1596

### 7.7 Correlación de OSI con concentración de metabolitos en las muestras biológicas de los niños de Tepetitla de Lardizábal.

El mejor modelo explicativo de la variable lnOSI (AIC= 1.958) se presenta en la Tabla 12 y está compuesto por las variables: puntaje Z de metabolitos ( $p=0.02$ ), y los genotipos CYP2E1 *RsaI* *c2c2* ( $p=0.04$ ), NQO1 *C609T* *CC* ( $p=0.01$ ) y GSTT1 *presente* ( $p=0.02$ ). Sólo en el caso de la variable puntaje Z de metabolitos se da una correlación negativa, mientras que, con las demás variables la correlación es positiva. Estos resultados confirman que hay una correlación en el comportamiento del OSI con los puntajes Z de metabolitos de exposición a VOC y con los alelos o genotipos mencionados que ya se habían encontrado con las otras pruebas. Así se tendría, que un niño de Tepetitla de Lardizábal que presenta un nivel bajo de metabolitos en orina tiende a tener un OSI elevado, y que ese OSI será mayor si el niño porta los polimorfismos considerados como de riesgo por estar expuestos a VOC. Este mismo modelo, aplicado a los datos obtenidos en las muestras de los niños de la comunidad de San Juan Ixtenco, no explica el comportamiento de la variable lnOSI (Tabla 12).

**Tabla 12.-** Variables que correlacionan con lnOSI en el modelo lineal generalizado para las muestras biológicas de los niños de las comunidades de Tepetitla de Lardizábal, y comparación del mismo modelo con las muestras de los niños de la comunidad de San Juan Ixtenco.

InOSI	Coefficiente de cambio	Error estándar	$p > z$	95% de intervalo de confianza	
TEPETITLA DE LARDIZÁBAL					
Puntaje Z de metabolitos	-0.06	0.03	<b>0.02</b>	-0.11	-0.01
CYP2E1 <i>RsaI</i> ( <i>c2c2</i> )	0.49	0.24	<b>0.04</b>	0.02	0.95
NQO1 <i>C609T</i> ( <i>CC</i> )	0.35	0.14	<b>0.01</b>	0.08	0.62
GSTT1 <i>presente</i>	0.61	0.27	<b>0.02</b>	0.08	1.1
AIC = 1.9					
SAN JUAN IXTENCO					
Puntaje Z de metabolitos	0.01	0.03	0.75	-0.05	-0.06
CYP2E1 <i>RsaI</i> ( <i>c2c2</i> )	0.59	0.48	0.22	-0.36	1.5
NQO1 <i>C609T</i> ( <i>CC</i> )	-0.31	0.24	0.09	-0.67	1.2
GSTT1 <i>presente</i>	0.15	0.25	0.55	-0.35	0.65
AIC =2.1					

## 8 DISCUSIÓN

Como indican los datos presentados por Landrigan *et al.* (2017), la influencia de los contaminantes ambientales sobre la salud de los seres humanos se ha comprobado por el aumento en la incidencia de enfermedades relacionadas con este tipo de exposición. En el mismo documento, se cita el hecho de que en los países en desarrollo con una rápida “modernización”, y por lo tanto industrialización, se está presentando un fenómeno de contaminación a matrices ambientales. En el caso las aguas superficiales que reciben descargas de sustancias químicas con diferentes potenciales tóxicos, y como resultado se está observando la aparición de afecciones relacionadas como pueden ser hepatotoxicidad, carcinogenicidad, nefrotoxicidad, inmunosupresión, neurotoxicidad, alteraciones endocrinas, entre otras, que afectan la calidad de vida de las poblaciones expuestas y cercanas a fuentes de contaminación, e incluso, también afectan el desarrollo e integridad de los niños de las comunidades, al nacer y crecer en condiciones ambientales desfavorables. Por poner un ejemplo, se tiene que México, que es uno de estos países que sufre un acelerado desarrollo, es el país latinoamericano con mayor incidencia de leucemia infantil según datos de Curado *et al.* (2011).

Enfocándonos en la Cuenca del río Atoyac, afectada por las descargas industriales, los datos sobre incidencia de cáncer en la población son escasos: una revisión de Palma y Morales (2011) cita que en poblaciones asentadas a las orillas del río Atoyac se ha presentado un aumento en la incidencia de cáncer en adultos, pero también se reportan casos de leucemia en niños; esto coincide con la percepción de los habitantes de estas comunidades que en periodos anteriores a la llegada de las industrias no conocían estas enfermedades ni otros padecimientos que se han manifestado con mayor frecuencia a partir del siglo XXI, como son anemia, trastornos dermatológicos e insuficiencia renal (Palma y Morales, 2011).

En el trabajo de Montero *et al.* (2006), se determinó con biomarcadores de efecto temprano el impacto de vivir cerca del río Atoyac y de la actividad ocupacional en estas comunidades. Se encontró un aumento en micronúcleos (biomarcadores de genotoxicidad), en muestras de linfocitos de sangre periférica de adultos, en comparación con muestras de personas de la Ciudad de México, y este incremento fue mayor en los habitantes cuyas viviendas se encontraban más cerca de la ribera del río Atoyac (Montero *et al.*, 2006). No se observó diferencia con respecto a la ocupación entre las que se contaban agricultores, obreros de industrias y amas de casa. De tal forma que para el presente estudio se eliminó la variable de exposición ocupacional, para únicamente determinar el impacto de habitar en las cercanías del río, y por ello el biomonitorio se hizo sólo en la población infantil, además, por ser una población más susceptible a los efectos tóxicos de los contaminantes presentes en el área.

Así es como el presente estudio tuvo como objetivo estudiar diversos biomarcadores en niños que nacieron y están creciendo en estos entornos, y se compararon con una población infantil alejada del río y por lo tanto, no expuesta el mismo tipo de fuentes de contaminación.

Se seleccionó al Índice de Estrés Oxidante (OSI) como biomarcador de efecto temprano por aportar un enfoque sistémico de las condiciones que presenta un individuo, al hacer las determinaciones en plasma sanguíneo y por ser un ensayo rápido, estable, confiable y

automatizado. El metabolismo celular genera ROS y RL con el potencial de dañar biomoléculas, los organismos poseen mecanismos antioxidantes para mantener su homeostasis, pero en una situación de exposición crónica a xenobióticos, se podría perder la relación fisiológica entre moléculas químicas oxidantes y antioxidantes, provocando un aumento en el estado oxidante, dando como resultado la aparición de estrés oxidante, condición asociada con problemas de salud, incluidos el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Riechelman, 2004; Bhattacharyya *et al.*, 2014; Smith *et al.* 2016).

En este estudio se observó un aumento significativo del OSI en las muestras de plasma sanguíneo de los niños estudiados de Tepetitla de Lardizábal, una comunidad cercana al río Atoyac altamente contaminado, en comparación con muestras biológicas de los niños de San Juan Ixtenco una comunidad alejada del río: se encontró una TAC significativamente disminuida en los niños de Tepetitla de Lardizábal (Figura 15b, Tabla 9), mientras no hubo diferencia entre la distribución relativa al TOS de las muestras de los niños estudiados de ambas comunidades (Figura 15a, Tabla 9); no existen estudios en niños, ni en adultos, que relacionen la exposición ambiental con la modificación de los biomarcadores TAC y OSI, por esto, el presente trabajo puede servir como una propuesta para que éstos sean utilizados como biomarcadores efectivos en el biomonitoreo de poblaciones humanas expuestas, ya que los métodos empleados para su determinación son simples, rápidos, reproducibles y su costo es bajo.

Se han realizado estudios de exposición indirecta a contaminantes similares a los encontrados en la zona del río Atoyac, en específico a la exposición al humo de cigarro cuyos componentes son el tolueno, el cloruro de vinilo y el fenol, entre otros, resultados similares a lo encontrado en nuestro estudio se describen en niños y bebés expuestos de manera pasiva al humo de cigarro, donde encontraron una TAC disminuida y un aumento en el OSI (Aycicek *et al.*, 2005; Kosecik *et al.*, 2005). La disminución basal de la TAC en los niños de la comunidad de Tepetitla de Lardizábal podría deberse a la exposición a las mezclas de xenobióticos, específicamente de VOC, como se muestra en las determinaciones de las concentraciones de BTEX en aire en donde en todos los casos se encontraron concentraciones en el orden 1:2 en la comparación entre la zonas San Juan Ixtenco: Tepetitla de Lardizábal (Figura 7). Partiendo del supuesto de que esta exposición se ha dado de manera constante a lo largo de varios años, podría haber resultado en la inhibición de mecanismos antioxidantes. Estos datos concuerdan con lo descrito en un modelo de rata, en el que la administración de una mezcla de VOC (cloroformo-diclorometano-tolueno), provocó la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRed), superóxido dismutasa (SOD), así como la tasa de glutatión-glutatión disulfuro (GSH/GSSG) (Belmont *et al.*, 2014); también es consistente con los resultados observados en un grupo de trabajadores expuestos a tolueno en el que se encontró hipometilación en el promotor de CYP2E1 con aumento de su expresión, en contraste con un aumento en la metilación de GSTP1 disminuyendo su expresión (Jiménez- Garza *et al.*, 2015). Además, la TAC disminuida en los niños de Tepetitla de Lardizábal podría deberse a deficiencias en vitamina C y proteínas que aportan grupos sulfhídrido, que como describe Erel (2004) son las moléculas plasmáticas que tienen mayor participación en la TAC (Tabla 7). En este contexto la dieta podría ser un factor relevante, independientemente de que los hábitos alimenticios entre los niños de las comunidades de estudio



son muy semejantes, según lo informado por los padres en las encuestas, con un consumo de carnes rojas y blancas, huevos, leche, frutas y verduras en cantidades y periodos similares, e incluso un consumo similar de comida chatarra. Sin embargo, la presión ambiental en Tepetitla de Lardizábal es mayor que en San Juan Ixtenco, lo cual podría consumir sus reservas antioxidantes y de esta manera, elevar sus requerimientos de estos en la dieta.

Otro resultado que llama la atención es el relativo al Índice de Masa Corporal (IMC) que está elevado para la edad de los niños varones y las niñas de San Juan Ixtenco y las niñas de Tepetitla de Lardizábal (de acuerdo con las tablas del Proyecto FANTA, 2012). En cambio, el 9% de los niños varones de Tepetitla de Lardizábal presentan un IMC bajo, en comparación con los niños de San Juan Ixtenco que son un año menor en promedio que los niños de Tepetitla de Lardizábal. A pesar de estas diferencias, la distribución del OSI fue elevada en las muestras del estudio tanto en niñas como en niños varones de Tepetitla de Lardizábal, y no se encontró correlación entre el IMC con ninguno de los parámetros de estrés oxidante, lo cual indica que los resultados se deben a otros factores, como al estrés ambiental.

En las muestras de plasma sanguíneo de los niños de la comunidad de Tepetitla de Lardizábal no se observó un aumento en el TOS en comparación con las muestras de San Juan Ixtenco. Este estudio fue realizado en niños sanos, lo que implica que aún con la disminución en la defensa antioxidante encontrada en las muestras de los niños de Tepetitla de Lardizábal, su organismo es capaz de contener contra la formación de especies oxidantes generadas por la exposición a VOC ambientales, y de mantener un aparente estado de homeostasis; estos resultados concuerdan con el trabajo de Aycicek (2005) que reporta en una muestra poblacional de niños fumadores pasivos. De no mantener este estado, se observaría un aumento en el TOS como se ha descrito en niños con padecimientos como enfermedad renal crónica, trombocitopenia aguda, desórdenes de ansiedad (Guney *et al.*, 2014; Cura *et al.*, 2016; Maciejczyk *et al.*, 2018) o alternativamente, se observaría un incremento en otro tipo de daño relacionado, como por ejemplo, mayor genotoxicidad o mayor citotoxicidad en tejidos por lipoperoxidación, lo cual no se evaluó en el presente trabajo. No obstante, el *Odds ratio* de 8.86 obtenido en la comunidad de niños de Tepetitla de Lardizábal supone un mayor riesgo de presentar un OSI alto en comparación con los niños de San Juan Ixtenco, que es una comunidad alejada de fuentes de contaminantes como las que se presentan en Tepetitla de Lardizábal. Y podría suponerse que de seguir bajo un régimen de exposición a sustancias contaminantes como el que tienen en estas comunidades, su organismo se volvería más susceptible a desarrollar enfermedades, que aquellos niños que se encontraran más alejados de estos.

En las mediciones de las muestras ambientales de BTEX para este estudio, se encontraron concentraciones por debajo de los niveles de referencia recomendados por la EPA para efectos no carcinógenos para ambas comunidades (Figura 7). Sin embargo, los niveles de benceno en aire se encuentran dentro de los niveles de riesgo de desarrollar leucemia (EPA-IRIS, 2012; EPA 2015), y además, las concentraciones encontradas en estas comunidades están en el rango de las reportadas en estudios de asociación con afectaciones a la salud, como daño al sistema respiratorio principalmente, pero también sobre el sistema inmune, atopias y desarrollo embrionario (Bolden *et al.*, 2015). Además, las concentraciones de metabolitos de algunas muestras de orina en ambas

comunidades sobrepasan los niveles del BEI establecido por la ACGIH (Figura 16), que están establecidos para personal adulto expuesto ocupacionalmente a estos compuestos (ACGIH 2015), lo que hace pensar que los niveles ambientales de referencia recomendados por la EPA-IRIS y que en otros países se toman como referencias se deberían revisar.

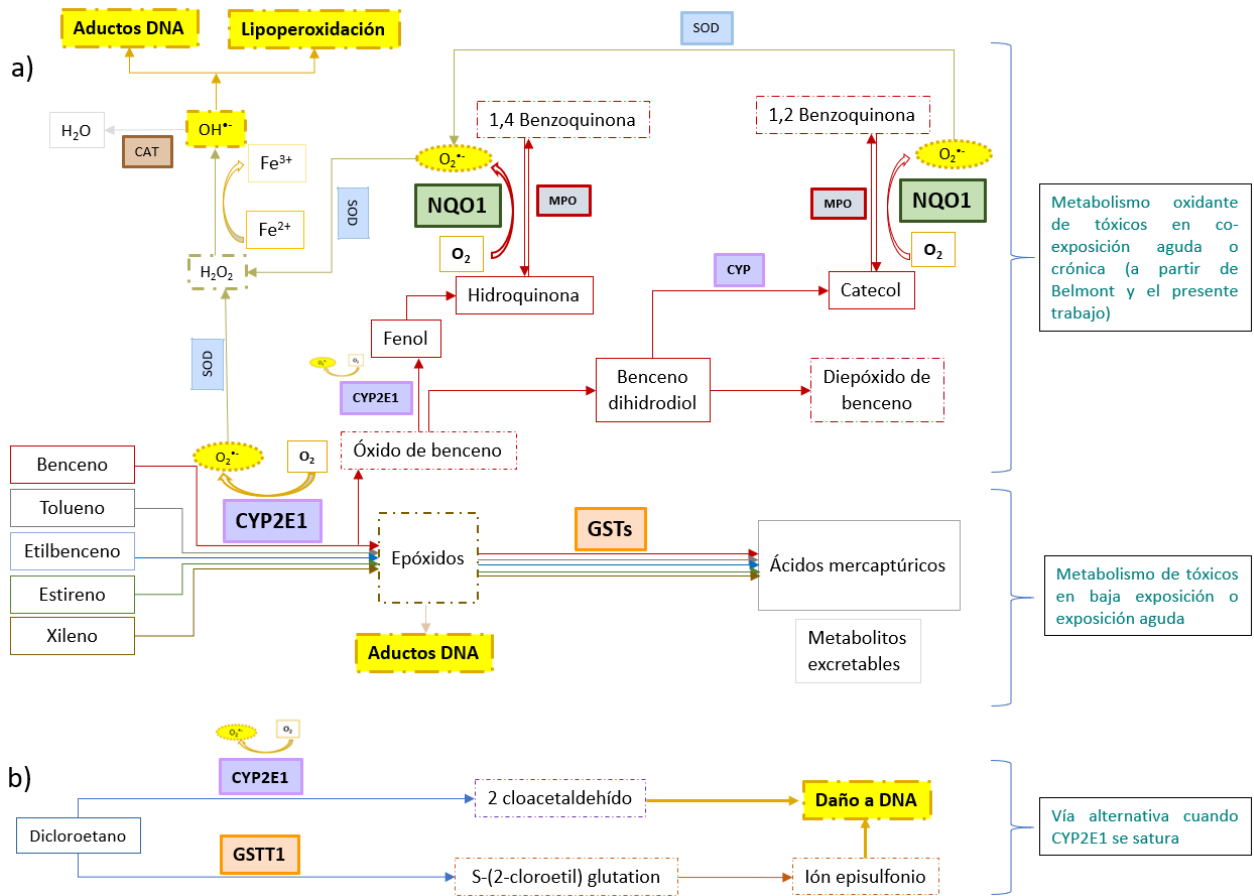
Los metabolitos de BTEX en orina se usaron para obtener una estimación de los niveles de exposición en cada comunidad, considerando también que otros VOC y compuestos tóxicos también están presentes. Los niveles de metabolitos medidos en las muestras de orina de los niños de San Juan Ixtenco y Tepetitla de Lardizábal son similares, lo cual parecería un indicador de que no hay diferencias entre las exposiciones, sin embargo, como ya se puntualizó, se determinó una tasa de 1:2 respectivamente de estos contaminantes en el aire de las comunidades (Figura 7).

El comportamiento de la concentración de metabolitos con relación al OSI en las muestras biológicas de los niños de Tepetitla de Lardizábal reveló que existe una correlación negativa (Figura 17), que no corresponde a lo que podría esperarse de una población en condiciones óptimas, en las que si un organismo se expone a un xenobiótico su metabolismo forma metabolitos de desecho de acuerdo con las vías conocidas para mantener su homeostasis, esto iría de la mano con un OSI bajo, que es lo que se encontró en las muestras de los niños de San Juan Ixtenco. Los resultados nos revelan que los niños participantes de Tepetitla de Lardizábal ya presentan un OSI elevado en comparación con los niños de la comunidad de San Juan Ixtenco, lo cual nos habla de que se encuentran en desventaja al no contar con los mecanismos suficientes para inactivar o excretar la totalidad de metabolitos electrófilos y de ROS que se generan por el metabolismo de los BTEX (Cederbaum *et al.*, 2009, Rappaport *et al.*, 2010), lo que podría traducirse en mayores daños a macromoléculas en forma de lipoperoxidación, oxidación de DNA y/o daño genotóxico.

El comportamiento de la excreción de metabolitos de los niños que participaron en este estudio de la comunidad de Tepetitla de Lardizábal podría explicarse, en parte, por el aumento en la producción y activación de CYP2E1 en cuyo ciclo catalítico *per se* produce una gran cantidad de ROS, y que además la biotransformación de BTEX por esta vía da como resultado la formación de metabolitos tóxicos como los epóxidos y en el caso del benceno, también lleva a la producción de quinonas (Figura 18) (Cederbaum *et al.*, 2009; Rappaport *et al.*, 2010), lo que resultaría en un exceso de ROS en el organismo haciéndolo incapaz de desactivarlas, y por lo tanto, excretarlas. Esta respuesta se observó en el trabajo de Belmont *et al.* (2014) quienes vieron un aumento de la actividad de CYP2E1 por la exposición a una mezcla de VOC y en los resultados de Jiménez-Garza *et al.* (2015) en los que se observó hipometilación de la región promotora del gen de CYP2E1 que está relacionada con un aumento en la expresión de RNA mensajero (RNAm) y posiblemente aumenta también la actividad de la enzima.

Otra vía por la cual podrían explicarse estos resultados es por el propio metabolismo de los BTEX, y la manera en que actúan en el organismo dependiendo de las concentraciones en los que se presente la mezcla en el ambiente. Como ya se mencionó de acuerdo con modelos farmacocinéticos descritos por la ATSDR (2004), a bajas concentraciones de exposición en los organismos, el CYP2E1 participa como la principal vía de biotransformación dando paso a la formación de metabolitos oxidados altamente reactivos como son los epóxidos, mientras que a altas

concentraciones se produce un mecanismo de inhibición metabólica competitiva, donde CYP2E1 se satura, dando paso a la acción de otras isoenzimas del complejo del citocromo P-450, y la consecuente formación de metabolitos glucuronidados, sulfatados, etc., contribuyendo de este modo a la desintoxicación del organismo o, por el contrario, a la generación de más especies oxidantes que a su vez generarían aumento en el índice de estrés oxidante observado.



**Figura 18.-** a) Vías de biotransformación y bioactivación de BTEX. b) Vías de biotransformación y bioactivación de dicloroetano. CYP2E1: citocromo P450 2E1, GSTT1 y GSTM1: glutatión S-transferasa T1 y M1, NQO1: NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1, SOD: superóxido dismutasa, Cat: catalasa, MPO: mieloperoxidasa. (Elaboración personal).

Otro punto que considerar en los resultados del estrés oxidante y los metabolitos, se trata de los polimorfismos presentes en la población; como se observa en las Tablas 10 y 11, los genotipos que correlacionaron con un aumento en el OSI en las muestras de la población de Tepetitla de Lardizábal fueron CYP2E1 *Rsal c2c2*, GSTT1 *presente* y NQO1 *C609T CC*. Si bien se ha establecido que puede haber un aumento en el metabolismo por CYP2E1 atribuible a la inducción de la enzima por la exposición crónica a BTEX (Belmont *et al.*, 2014; Jiménez-Garza *et al.*, 2015), también se ha

documentado aumento en la producción de la enzima en personas portadoras del alelo *c2* de CYP2E1 *RsaI*, y en los niños estudiados en Tepetitla de Lardizábal, el genotipo homocigoto *c2c2* correlacionó con un aumento en el OSI. En relación con el genotipo GSTT1 *presente*, la enzima se ha asociado con la producción de metabolitos tóxicos al bioactivar di y trihaloalcanos, como el diclorometano que es transformado en S-(2-cloroetil) glutatión y este a su vez en ion episulfonio (Figura 18b) (Chia *et al.*, 1997; Akiba *et al.*, 2017). Si bien en este proyecto no se contempló la medición de metabolitos de estos compuestos, no se puede descartar su participación en el incremento en el estrés oxidante, dado que se ha reportado la presencia de diclorometano en el río Atoyac (IMTA-CONAGUA 2008; CONAGUA-SEMARNAT, 2011; GREENPEACE, 2014). Otra posible acción de GSTs, en general, es que, si sustituyen a moléculas como la hidroquinona, resultante del metabolismo del benceno, con más de una molécula de GSH, los metabolitos resultantes son altamente tóxicos para la médula ósea, disminuyendo la eritropoyesis (Snyder, 2007).

El genotipo NQO1 *C609T CC* (considerado nativo) también correlacionó con un aumento en OSI, esto podría explicarse porque NQO1 dismuta la *p*-benzoquinona a hidroquinona, pero esta molécula, dada su inestabilidad en pH fisiológico, entra a un ciclo redox por autooxidación o reorganización en el que se forman ROS (Figura 18a) contribuyendo al aumento del estrés oxidante (Watanabe *et al.*, 2004; Ross y Siegel, 2017).

Los polimorfismos metabólicos que se estudiaron en este proyecto son polimorfismos de baja penetrancia, siempre que las presiones ambientales permanezcan bajas (Vineis *et al.*, 1999); pero cuando la exposición a compuestos tóxicos es crónica, los efectos de estas variaciones alélicas pueden ser evidentes, como es el caso de lo encontrado en las muestras biológicas de los niños de la población de Tepetitla de Lardizábal en la que se observaron estas correlaciones entre incremento en el OSI con los genotipos mencionados, mientras que en las muestras de los niños de San Juan Ixtenco, no se encontró correlación con ningún genotipo.

Debido a la frecuencia de los polimorfismos observados en esta población, estos resultados son una advertencia para las autoridades de salud pues representan una población susceptible a la exposición a VOC. La frecuencia del genotipo *c2c2* de CYP2E1 *RsaI* fue de 0.09; del genotipo *CC* de NQO1 *C609T* fue de 0.32 (las frecuencias de genotipo no se presentan en la Tabla 10, sólo se muestran las frecuencias alélicas), y 0.93 para GSTT1 *presente* (homocigoto y heterocigoto). Si se consideran individuos portadores de dos o tres de estos genotipos susceptibles, una proporción de 0.32 de personas son susceptibles a este tipo de ambiente, llevando dos de estos genotipos, y la proporción de los más susceptibles, que portan tres genotipos susceptibles es 0.03, para un total de 0.35, demasiado alto para cualquier población. Comparados con otros grupos en el mundo, las frecuencias alélicas de estos polimorfismos son mayores en mexicanos que en los europeos, los africanos o los afroamericanos, y son similares a las de los asiáticos.

El trabajo de la academia ha sido un enorme aporte para comprender la problemática sobre asuntos relacionados con las interacciones contaminación ambiental – salud en los países en desarrollo, sin embargo, muchos de estos avances no son conocidos por las autoridades correspondientes porque la comunicación entre academia y gobierno no llega a darse de manera efectiva, por la razón de que en estos países no se trabaja de manera conjunta. Los gobiernos deben

de proveer a las comunidades de sistemas adecuados para el saneamiento de sus aguas, como parte de su derecho fundamental de tener acceso a agua limpia, y dentro de este contexto, en marzo del 2017 la Comisión Nacional de Derechos Humanos en México emitió una recomendación sobre la violación a los derechos humanos a un medio ambiente sano, saneamiento del agua y acceso a la información, a todos los órganos de gobierno, en relación con la contaminación de los ríos Atoyac, Xochiac y sus afluentes (CNDH, 2017); en la que a partir de una denuncia presentada por asociaciones civiles y población en general, se recabaron todas las investigaciones existentes en torno a este caso, para dictaminar que las instituciones SEMARNAT, CONAGUA, PROFEPA, COFEPRIS, los gobernadores de los estados de Puebla y Tlaxcala, así como los presidentes municipales de las comunidades afectadas, deben de trabajar en colaboración para dar una resolución integral a la problemática que se desarrolla en esa región, y así garantizar que los derechos humanos que están siendo agraviados se respeten, en beneficio de la población en general. Algunas de las acciones que se recomiendan en el documento, establecen que, aunque ya existen 17 monitores de contaminantes en agua en los afluentes afectados, los gobiernos deben implementar una mejor red para realizar monitoreos de manera periódica y más eficiente; así como instruir personal que reconozca las violaciones a los derechos humanos tanto en las industrias, como en las descargas, para que estas no sean pasadas por alto como ha venido sucediendo durante años; además se puntualiza la importancia del derecho a la información tanto para los tomadores de decisiones, como para la población, para garantizar que se aplique el principio precautorio con base en el conocimiento. Este documento queda como un precedente de acción, para las instituciones y la población, que puede tomarse como ejemplo para otras regiones del país igualmente impactadas (López y Montero 2018). Tiene omisiones, como por ejemplo, no menciona la necesidad de establecer una red de monitoreos de la calidad del aire en las comunidades aledañas al río de donde emanan los contaminantes para distribuirse en toda la zona, pero los pobladores, ya sensibilizados con el problema ambiental, lo demandan en documentos que han presentado a las autoridades para rescatar la zona (Centro Fray Julián Garcés, 2018).

## 9 CONCLUSIONES

Los niños de la comunidad de Tepetitla de Lardizábal al presentar modificaciones en biomarcadores de estrés oxidante, en comparación con los niños de San Juan Ixtenco, tienen mayores probabilidades de desarrollar enfermedades relacionadas con contaminación ambiental. Estas diferencias en la modulación del estrés oxidante parecen estar relacionadas con una disminución en la excreción de metabolitos y con los genotipos con variantes polimórficas CYP2E1 *RsaI* c2c2, NQO1 C609T CC y GSTT1 *presente*, lo cual en conjunto con las afectaciones en el sistema antioxidante podrían representar una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades como las presentes en esa zona de estudio. Los problemas de salud esperados para estos niños a medida que crecen implican una amplia gama de trastornos, incluidos el cáncer y los riesgos de fertilidad para ellos y sus hijos.

## 10 EPÍLOGO

Finalmente, como parte del presente estudio se entregó a los padres de los niños que participaron donando sus muestras biológicas, el resultado de los análisis clínicos, y en el caso de encontrar anomalías determinadas por profesionales en salud (cristales en orina, eritrocitos en orina) fueron derivados con el apoyo del “Centro Fray Julián Garcés” con médicos especialistas para su observación oportuna.

Además, Investigadores y estudiantes de diversos centros de la UNAM, como son la Facultad de Economía, el Instituto de Ingeniería, la Facultad de Ciencias, el Instituto de Investigaciones Biomédicas, y de la UAM-Azcapotzalco en conjunto con las organizaciones no gubernamentales (ONG): Centro “Fray Julián Garcés” para los derechos humanos y desarrollo local A.C., la Red de jóvenes en defensa de los pueblos y la coordinadora “Por un Atoyac con vida” de Tlaxcala, y Dale la Cara al Atoyac A.C. de Puebla, han estado trabajando en convenios para intervenir en el proceso de saneamiento del río Atoyac y la prevención de las enfermedades asociadas con la contaminación. Han organizado campañas de sensibilización en la región mediante talleres y foros públicos, trabajando en las comunidades para fomentar una adecuada comunicación de riesgo hacia los pobladores y afectados por la contaminación de la zona, así como para elaborar estrategias de protección y prevención, enfocándose en brindar información sobre el riesgo ambiental y ocupacional a la salud, la importancia de una buena alimentación, y de la protección al ambiente. La Figura 19 es una muestra del esfuerzo realizado por ONG en la zona, para difundir el riesgo ambiental, ecológico y de salud entre los habitantes de las comunidades afectadas, y para llamar la atención de las autoridades. Así es como en algunas de las comunidades en Tlaxcala se ha impulsado la elaboración de ecotecnias que evitan que se sigan descargando las aguas domésticas en los drenajes municipales que tienen como destino el río Atoyac (Centro Fray Julián Garcés, 2018), y en Puebla se cuenta con un “Observatorio Atoyac” en el que los ciudadanos tienen la opción de denunciar las descargas y evidenciarlas en una plataforma digital (Dale la cara al Atoyac, 2018), ambas acciones buscan incidir en los gobiernos municipales y estatales para demostrar el nivel de compromiso por parte de una ciudadanía responsable para que se logre el saneamiento del río.



# La cuenca del Atoyac-Zahuapan: historia de nuestra lucha ¡Por un Atoyac con vida!

**Hace no tantos años...**

...los ríos Atoyac y Xochiác. llevaban agua bonita, donde los que ahora somos viejos nadábamos cuando éramos niños, entre acociles, ajolotes, ranas y peces que pescábamos para comer. Con el río aprendimos a nadar y a hacer comunidad...

En Tlaxcala, las comunidades vivimos nuestras tradiciones y costumbres alrededor de nuestras 32 variedades de maíz y nuestros ríos, como el Atoyac, y el Xochiác, que estaban llenos de vida y nos daban de comer, nos hablaban y nos alegraban la vida porque, hasta cuando se desbordaban, abonaban nuestras tierras.

**Hasta que...**

En 1962 llegó la autopista México-Puebla, ...

En 1965 se construyó la planta de Volkswagen en Puebla.

Desde entonces, ha producido más de 10 millones de autos. Pero, para producir cada uno, se requieren 450 mil litros de agua.

Con el agua que ha usado esta empresa para producir autos en 201 años, se podría dotar de agua a toda la población actual de Puebla y Tlaxcala juntas durante siete años, o a la mitad de la población del país en un año.

**Y, finalmente...**

En 1998 se instaló el Complejo Petroquímico Independencia, de Perex, en San María Texcali.

**1. Industrialización**

Con la llegada de estas empresas, empezó un acelerado proceso de...

- Industria Cerámica (emertina no metálica)
- Industria de Plásticos y Hule
- Industria Química
- Industria Textil (Merzifla)
- Industria Papelera
- Industria Maderera
- Industrias automotriz y de autopartes
- Industria Alcolmecánica (emertina metálica)
- Industria de Alimentos

**2. Contaminación química de las tierras de cultivo**

Bayer produce anualmente en Tlaxcala entre 12 y 14 millones de litros de agroquímicos para consumo nacional e internacional.

Según la OMS cada año 5 millones de personas presentan altos niveles de intoxicación por agroquímicos y cerca de 800 mil mueren.

Los agroquímicos contaminan el medio ambiente, los ríos la salud y producen abortos, malformaciones en bebés, problemas en las visiones, reñones y endocrinos.

¡Pero también luchan contra la vida la toxemia y la ciberesud y compesud!

**3. Urbanización**

Entre 1970 y 2010, el crecimiento de la población de Tlaxcala fue de 303%, mientras que el promedio de todo México fue de 240%!

El parque vehicular aumentó 1,610 por ciento

En 1980 había 23 mil autos en Tlaxcala

Y para 2015, ya había 397 mil 124 autos

**4. Megaproyectos**

El Proyecto Integral Atlixco es un megaproyecto energético de 132 km que afecta a decenas de pueblos de Tlaxcala, Puebla y Morelos porque despoja tierra y nos expone a la presencia de un agroquímico.

Este tipo de megaproyectos están pensados para favorecer las actividades industriales de la región y atraer nuevas empresas.

**Procesos que derivaron en...**

La contaminación tóxica de los ríos, canales y zanjas, porque todos vierten sus aguas residuales en ellos

En una grave crisis de salud para los pobladores de nuestras comunidades

Desde que el agua está contaminada, en nuestras comunidades hemos visto enfermedades nuevas como cáncer, leucemia, paragra trombocitopenica, insuficiencia renal y otras.

Hoy, sabemos que las sustancias en las descargas y en el agua del río son tóxicas y sus efectos nos han traído cáncer y otras enfermedades.

**Sin embargo,...**

En marzo de 2017 nos dieron la razón:

**CNDH Recomendación 10/2017**

Que el gobierno y las empresas han violado, por más de 20 años nuestros derechos humanos.

Que la contaminación del río sí nos enferma y mata.

Que si el gobierno y las empresas no actúan inmediatamente, la contaminación y las enfermedades van a empeorar.

**Nosotras y nosotros agregamos:**

- Reconocimiento oficial de que se nos han producido daños graves
- Vigilancia y sanción a las empresas que contaminan.
- Participar en el proceso de saneamiento, con nuestros saberes.
- Atención médica urgente y humana para los enfermos.
- Reparación integral del daño y garantía de no repetición

**¡No hay justicia social sin justicia ambiental!  
¡Queremos nuestros ríos limpios!**

¡Súmate a este proceso!  
Tel. 01 248 40 11 43 29 Correo atoyacresuscitados@gmail.com  
www.centroafayulanguajes.org.mx/  
¡Luchamos por un Atoyac con vida!

Diseño gráfico: Adriana Medina Rodríguez. Los indígenas de las parotas son de Río Temoahuc. Se utilizaron con permiso de Río Temoahuc Memorial Forest (river.com)

Figura 19.- Cartel explicativo de la problemática en la región afectada por la contaminación del río Atoyac.

## 11 REFERENCIAS

- Abe, K.C., Simone, G. 2016. Health Impact Assessment of Air Pollution in São Paulo, Brazil. *Int J Environ Res Public Health*.13(7): 694
- ACGIH. 2015. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists
- Ait-Helal, W., Borbon, A., Sauvage, S., de Gouw, J.A., Colomb, A., Gros, V., Freutel, F., Crippa, M., Afif, F., Baltensperger, U., Beekmann, M., Doussin, J.F., Durand-Jolibois, R., I. Fronval, N. Grand, T. Leonardis, M. Lopez, V. Michoud, K. Miet, S. Perrier, A. S. H. Prévôt, J. Schneider, G. Siour, P. Zapf, Locoge, N. 2014. Volatile and intermediate volatility organic compounds in suburban Paris: variability, origin and importance for SOA formation. *Atmos. Chem. Phys.*, 14: 10439-10464
- Akiba, N., Shiizaki, K., Matsushima, Y., Endo, O., Inaba, K., Totsuka, Y. 2017. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis* 32: 455-462 doi:10.1093/mutage/gex014
- Ancona, C., Bauleo, L., Massari, S., Sozzi, R., Davol M., Forastiere F. 2016. Long term effects of industrial pollution: a residential cohort approach in the Civitavecchia area (Central Italy) En: Abstracts of the 2016I Epidemiology (ISEE). Abstract S-044. Research Triangle Park, NC: Environmental Health Perspectives
- Arellano, O., Ortega-Elorza, L., Gesundheit-Montero, P. 2012. Estudio de la contaminación en la cuenca de río Santiago y la salud pública en la región. Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad (resumen ejecutivo)
- Arellano, O., Solís-Angeles, S., Serrano-García, L., Morales-Sierra, E., Méndez-Serrano, A., Montero-Montoya, R. 2015. Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study. *Journal of FisheriesSciences.com*; 9(4): 52-62.
- ATSDR – Toxic substances portal; <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/index.asp> (Acceso junio 2018).
- ATSDR. 1997. Toxicological profile for benzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR. 2004. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction profile for: benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). US Dep. of Health and Human Services
- Aycicek, A., Erel, O., Kocyigit, A. 2005. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int* 47:635-639.
- Barceló, G.I., Solís-Correa, H., Ávila, P., López, G., Gómez, S., García A. 2012. Determination of Distributions of Cd, Cu, and Pb Concentrations in Sediments of a Mexican Reservoir to Infer Their Environmental Risk. *Biol Trace Elem Res.* 148:122-132
- Barreto, G., Madureira, D., Capani, F., Aon-Bertolino, L., Saraceno, E., Alvarez-Giraldez, L.D. 2009. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: An oxidative DNA damage pathway. *Environ Mol Mutagen* 50(9):771-80. doi: 10.1002/em.20500.
- Batterman, S., Feng-Chiao, S., Li, S., Mukherjee, B., Jia, C. 2014. Personal Exposure to Mixtures of Volatile Organic Compounds: Modeling and Further Analysis of the RIOPA Data. *Resp Rep Health Eff Inst.* 181: 3-63
- Belmont, D.J., López-Gordillo, A.P., Molina, Garduño, E., Serrano-García, L., Coballase-Urrutia, E., Cárdenas-Rodríguez, N., Arellano-Aguilar, O., Montero-Montoya, R.D. 2014. 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. *Biomed Res Int* 2014:425070.
- Betancourt, O., Tapia M., Mendez I. 2015. Decline of General Intelligence in Children Exposed to Manganese from Mining Contamination in Puyango River Basin, Southern Ecuador. *EcoHealth* 12, 453-46
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E. 2014. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 94:329-354.



- Bind, M.A., Coull, B., Suh, H., Wright, R., Baccarelli, A., Vokonas, P., Schwartz, J. 2014. A novel genetic score approach using instruments to investigate interactions between pathways and environment: Application to air pollution. *PLoS One* 9:e96000.
- Bolden, A.L., Kwiatkowski, C.F., Colborn, T. 2015. New look at BTEX: Are ambient levels a problem? *Environ Sci Technol.* 49(9):5261-5276.
- Cederbaum, A.I., Lu, Y., Wu, D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 83:519–548.
- Centro Fray Julián Garcés. 2018. Propuesta Comunitaria Para el Saneamiento Integral de la cuenca Atoyac-Zahuapan y la Reparación del Daño a las Comunidades.
- Chen, C., Shang-shyue, T., Yang C. 2015. Association between Fine Particulate Air Pollution and Daily Clinic Visits for Migraine in a Subtropical City: Taipei, Taiwan. *Int J Environ Res Public Health.* 12(5): 4697–4708.
- Chen, Y., Li, G., Yin, S., Ju, Z., Ji, Z., Xiu, X., Liu, I., Ma, D. 2007. Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed populations. *Xenobiotica*, 37(1): 103–112
- Chia SE, Goh VH, Ong CN. 1997. Endocrine profiles of male workers with exposure to trichloroethylene. *Am J Ind Med* 32:217–222.
- Chong, E.T., Lee, C.C., Chua, K.H. 2014. RsaI but not DraI polymorphism in CYP2E1 gene increases the risk of gastrointestinal cancer in Malaysians: a case–control study. *BMJ* 4: e004109. doi:10.1136/bmjopen-2013-004109
- CNDH, 2017. Recomendación No. 10/2017 Sobre la violación a los derechos humanos a un medio ambiente sano, saneamiento del agua y acceso a la información, en relación con la contaminación de los ríos Atoyac, Xochiac y sus afluentes; en agravio de quienes habitan y transitan en los municipios de San Martín Texmelucan y Huejotzingo, en el estado de Puebla; y en los municipios de Tepetitla de Lardizábal, Nativitas e Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, en el estado de Tlaxcala. México, 211 pp
- Coccini, T., Roda E., Sarigiannis D.A., Manzo L. 2010. Assessing health effects of environmental contaminants by molecular markers. Studies on methylmercury and polychlorinated biphenyls as examples of translational research in environmental toxicology. *G Ital Med Lav Ergon.* 32(1):5-12.
- Collins, J.E., Wright, C.L., Edwards, C.A., Davis, M.P., Grinham, J.A., Cole, C.G., Goward, M.E., Aguado, B., Mallya, M., Mokrab, Y., Huckle, E.J., Beare, D.M., Dunham, I. 2004. A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome. *Genome Biol.* 5 (10)
- Comstock, E., Sanderson, J.S., Clafin, G., Henner, W.D. 1990. GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18(12): 3670.
- CONAGUA. 2008. Evaluación del riesgo sanitario ambiental de las zonas aledañas al río Atoyac (resumen ejecutivo), 1–13.
- CONAGUA-SEMARNAT. 2011. DOF (Official Diary of the Federation), Declaratoria de clasificación de los ríos Atoyac y Xochiac o Hueyapan, y sus afluentes. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=55199672&fecha=506/07/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=55199672&fecha=506/07/2011) Accessed January 2018.
- Costa, C., Ozcagli, E., Gangemi, S., Schembri, F., Giambo, F., Androutsopoulos, V., Tsatsakis, A., Fenga, C. 2016. Molecular biomarkers of oxidative stress and role of dietary factors in gasoline station attendants. *Food and Chem Toxicol.* 90: 30-35
- Cotler A.H. 2012. Las cuencas hidrográficas de México, Diagnóstico y priorización, 1ª edición, SEMARNAT.
- Cura, M., Koç, A., Aksoy, N., Özdemir, Z.C. 2016. Effect of short-term, high-dose methylprednisolone on oxidative stress in children with acute immune thrombocytopenia. *Blood Res.* 51(4):261-267. doi: 10.5045/br.2016.51.4.261.
- Curado, M.P., Pontes, T., Guerra, M.E., Cancela, M.C. 2011. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica* 29:96–102.
- Deiana, L., Carru, C., Pes, G., Tadolini, B. 1999. Spectrophotometric measurement of hydroperoxides at increased sensitivity by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. *Free Radic Res.* 31, 237-244
- Dougherty, D., Garteb, S., Barchowsky, A., Zmudac, J., Taioli, E. 2008. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure—A literature review. *Toxicology Letters* 182: 7–17

Eguchi-Ishimae, M., Eguchi, M., Ishii, E., Knight, D., Sadakane, Y., Isoyama, K., Yabe, H., Mizutani, S., Greaves, M. 2005. The association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *the hematology journal* 90(11): 1511

EPA. 2011. Volatile Organic Compounds (VOCs). Technical Overview. Disponible: <http://www.epa.gov/iaq/voc2.html#2>.

EPA, 2015 – Benzene Hazard Summary. Disponible: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/benzene.pdf> (Acceso febrero 2018).

EPA. 2016. 2014 National emissions inventory, versión 1 technical support document. Disponible: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-12/documents/nei2014v1\\_tsd.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-12/documents/nei2014v1_tsd.pdf)

EPA-IRIS. 2017. IRIS assessments-andvanced search. Disponible: <https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/atoz.cfm>

EPA-IRIS. 2012 Integrated Risk Information System on Benzene. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, D.C. Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/benzene.pdf> (acceso junio 2018).

Erel, O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 37:112–119.

Erel, O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38:1103–1111.

Fang, Z., Wu, Y., Zhang, N. 2017. Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and urinary cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(49): 86853-86864

FANTA III (Food and Nutrition Technical Assistance) 2012. [https://www.fantaproject.org/sites/default/files/resources/FANTA-BMI-charts-Enero2013-ESPAÑOL\\_0.pdf](https://www.fantaproject.org/sites/default/files/resources/FANTA-BMI-charts-Enero2013-ESPAÑOL_0.pdf) (acceso junio 2018).

Finkelman, J., Galvao, L., Henao, S. 2010. Gobernanza de la salud ambiental en América Latina. En: Galvao L, Finkelman J, Henao S, editores. *Determinantes ambientales y sociales de la salud*. Washington, DC: OPS, Mc Graw Hill Interamericana, 33-65.

Gamboa, R.M., Bravo, A., Ostrosky, S.P. 2008. Genotoxicidad en poblaciones infantiles expuestas a hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) en la atmosfera del estado de Tabasco. Tesis de Doctorado U.N.A.M.

García-Nieto E., Leticia-Carrizales Y., Li, J., García, E., Hernández A.E., Briones, C., Vázquez, C.O. 2011. Plomo y arsénico en la subcuenca del alto Atoyac en Tlaxcala, México lead and arsenic in the alto Atoyac sub-basin in Tlaxcala, México *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 17(1): 7-17

GBD. 2015. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2016; 388: 1459–544.

Giri, S., Yadav, A., Kumar, A., Dev, K., Gupta, R., Aggarwal, N., Seth, N., Gautam, S. 2011. Association of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with DNA damage in coal-tar workers. *Science of the total environment* 409: 465-469

Goodson, W., Lowe, L., Carpenter, D., Gilbertson, M., Ali, A., Salsamendi, A.L., Lasfar, A., Carnero, A., *et al.* 2015. Assessing the carcinogenic potencial of low -dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead *Carcinogenesis*, 36, suplemento 1, S254–S296

Gouveia, N., Habermann, M., Ozorio, L.S. 2016. Environmental health inequalities in contaminated industrial areas in Brazil. En: *Abstracts of the 2016I Epidemiology (ISEE)*. Abstract S-045. Research Triangle Park, NC: Environmental Health Perspectives.

Greenpeace, México. 2014. Ríos tóxicos: Lerma y Atoyac, la historia de negligencia continúa. Disponible: <http://www.greenpeace.org/>

Guney, E., Fatih, M.C., Tektas, A., Alisik, M., Ergin, M., Goker, Z., Senses, G., Ozturk, O., Korkmaz, A., Eker, F., Kizilgun, M., Erel, O. 2014. Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. *Journal of Affective Disorders* 156:62–66

- Hansen, A. y González-Márquez, L. 2010. Scenarios of metal concentrations in the Arcediano Dam (State of Jalisco, Mexico). *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 45(1): 99-106
- Hayashi, S.J., Watanabe, J., Nakachi, K., Kawajiri, K. 1991. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *Journal Biochemistry* 110: 559-565
- Hirvonen, A, Husgafvel-Pursiainen, K, Anttila, S, Vainio, H. 1993. The GSTM1-null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 14:1479–1481.
- IARC. 2012. Agents classified by the IARC monographs. International Agency for Research on Cancer, IARCL yon, Francia, 1–105
- IARC. 2016. Outdoor air pollution. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol 109. IARC-WHO. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol109/index.php> (acceso octubre 2017).
- IMTA-CONAGUA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y Comisión Nacional del Agua). 2008. Evaluación del Riesgo Sanitario-Ambiental de las Zonas Aledañas al río Atoyac. Resumen ejecutivo.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) (2011). Censo de Población y Vivienda, 2010 (Informe nacional y estatales), México. Disponible en: <http://www.censo2010.org.mx>
- Jarup, L. 2004. 2004. Mini-Monograph: Information Systems Health and Environment Information Systems for Exposure and Disease Mapping, and Risk Assessment. *Environ Health Perspect.* 112(9): 995–997.
- Jiménez-Garza, O., Baccarelli, A., Byun, H.M., Márquez-Gamiño, S., Barrón-Vivanco, B., Albores, A. 2015. CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit. *Toxicol Appl Pharmacol* 286:207–215.
- Johnson, E.S., Langard, S., Lin, Y. 2007. A critique of benzene exposure in the general population. *Sci of total Environ.* 374: 183-198
- Jones, P. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295: C849–C868
- Juang, D., Lee C.H., Wei C. Chen, Yuan C. 2010. Do the VOCs that evaporate from a heavily polluted river threaten the health of riparian residents? *Sci of the Total Environment.* 408: 4524–4531
- Katoh, T., Nagata, N., Kuroda, Y., Itoh, H., Kawahara, A., Kuroki, N., Ookuma, R., Bell, D.A. 1996. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 17(9):1855-9.
- Kohen, R. y Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *ToxicolPathol.* 30: 620–650
- Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E., Selek, S. 2005. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 100:61–64.
- Kumar, V., Shekhar Yadav, S., Kumar Datta, S., Singh, S., Ahmed, R., Goel, S., Gupta, S., Mustafa, M., Kumar Grover, R., Dev Banerjee, B. 2011. Association of GSTM1 and GSTT1 Polymorphism with Lipid Peroxidation in Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer: A Pilot Study. *Dis Markers* 30(4): 163–169 doi: 10.3233/DMA-2011-0774
- Lan, Q., Zhang, L., Li, G., Vermeulen, R., Weinberg, R.S., Dosemeci, M., Rappaport, S.M., Shen, M., Alter, B.P., Wu, Y., Kopp, W., Waidyanatha, S., Rabkin, C., Guo, W., Chanock, S., Hayes, R.B., Linet, M., Kim, S., Yin, S., Rothman, N., Smith, M.T, 2004. Hematotoxicity inworkers exposed to lowlevels of benzene. *Science* 306,1774–1776.
- Landrigan, J.P., Fuller, R., Acosta, J.R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N., Balde, A., Bertollini, R., O'Reilly, S., Boufford, J.O., Breyse, P., *et al.* 2017. The Lancet Commission on pollution and health, *Lancet.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
- Lao, X., Qiliu Peng, Yu Lu, Shan Li, Xue Qin, Zhiping Chen, Junqiang Chen. 2014. Glutathione S-transferase gene GSTM1, gene-gene interaction, and gastric cancer susceptibility: evidence from an updated meta-analysis. *Cancer Cell Int.* 2014; 14: 127. doi: 10.1186/s12935-014-0127-3

- Li, J., Lu, S., Liu, G., Zhou, Y., Lv, Y., She, J., Fan, R. 2015. Co-exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene and toluene and their dose-effects on oxidative stress damage in kindergarten-aged children in Guangzhou, China. *Sci of the total Environ.* 525: 74-80
- Lienharta, W., Gudipa, V., Uhlb, M., Bintera, A., Pulidoc, S., Safd, S., Zanggerc, K., Gruberb, K., Macheroux, P. 2014. Collapse of the native structure by a single amino acid exchange in human NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1). *FEBS J.* 281(20):4691-4704. doi: 10.1111/febs.12975.
- López, V.R., Méndez-Serrano, A., Albores-Medina, A., Oropeza-Hernández, F., Hernández-Cadena, L., Mercado-Calderón, F., Alvarado-Toledo, E., Herrera-Morales, S., Arellano-Aguilar, O., García-Vargas, G., Montero-Montoya, R. 2018. Oxidative stress index is increased in children exposed to industrial discharges and is inversely correlated with metabolite excretion of Voc. *Environ Mol Mutagen* doi: 10.1002/em.22207.
- López, V.R., y Montero, M.R. 2018. Monitoreo biológico y biomarcadores utilizados en estudios en poblaciones humanas cercanas a ríos impactados por contaminación química. En "Contribuciones al conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México, IPN, en prensa.
- Lucas, D., Ferrara, R., González, E., Albores, A., Manno, M., Berthou, F. 2001. Cytochrome CYP2E1 phenotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicology Letters* 124: 71-81
- Maciejczyk, M., Szulimowska, J., Skutnik, A., Taranta-Janusz, K., Wasilewska, A., Wiśniewska, N., Zalewska, A. 2018. Salivary Biomarkers of Oxidative Stress in Children with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med.* 7(8): E209. doi: 10.3390/jcm7080209.
- Malats, N., Camus-Radon, A., Nyberg, F., Ahrens, W., Constantinescu, V., Mukeria, A., Benhamou, S., Batura-Gabryel, H., Bruske-Hohlfeld, H., Simonato, L., Menezes, A., Lea, S., Lg, M., Boffetta, P. 2000. Lung Cancer Risk in Nonsmokers and GSTM1 and GSTT1 Genetic Polymorphism. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 9: 827–833
- Medinsky, M.A., Schlosser, P.M., Bond, J.A. 1994. Critical issues in benzene toxicity and metabolism: The effect of interactions with other organic chemicals on risk assessment. *Environ Health Perspect.* 102: 119-124
- Méndez-Serrano, A., Rosas Landa, O., Martínez, R., Rodríguez, A., Martínez-Hernández, G., Olvera-Carvajal, A., Galicia-Alonso, I., González-Juárez, G., Rosado-Zaidi, J., Hernández-García, M.G., López-Santos, J., Lara-Vázquez, L. 2017. La síntesis de la Recomendación 10/2017 de la Comisión Nacional de Derechos Humanos (CNDH), es un folleto informativo del Centro "Fray Julián Garcés", Derechos Humanos y Desarrollo Local A.C. y de la Coordinadora por un Atoyac con Vida (CAV), 1era edición.
- Montero R., 2016, Principios y aplicaciones de marcadores moleculares en estudios epidemiológicos, en prensa.
- Montero, R., Araujo, A., Carranza, P., Mejía, V., Serrano, L., Albores, A., Salinas, J.E., Camacho, R. 2007. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and Cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol* 79:299–312.
- Montero, R., Serrano, L., Araujo, A., Dávila, V., Ponce, J., Camacho, R., Morales, E., Méndez, A. 2006. Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: Comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 21:335–342.
- Navarro, I., Flores, E., Valladares, R. 2004. Estudio Ambiental. Informe. In: Morales Eduardo (ed.), Ambiente y Derechos Humanos. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local A. C., Tlaxcala, México 27–59 p.
- Nelson, H., Wiencke, J., Christiani, D., Cheng, T.J., Zuo, Z., Schwartz, B., Lee, B.K., Spitz, M.R., Wang, M., Ping Xu, X., Kelsey, K. 1995. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 16(5):1243-1245
- NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 2003. Fourth Edition. HIPURIC and METHYL HIPURIC ACIDS in urine. METHOD 8301, Issue 3: 2–5.
- NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 2014. Fifth Edition. S Benzylmercapturic acid and S-phenylmercapturic acid in urine: METHOD 8326, Issue 1: 2–10.
- NIOSH. 1994. Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition. PHENOL and p-CRESOL in urine: METHOD 8305, Issue 2: 2–4

Ogata, M y Sugihara, R. 1978. High performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of urinary phenylglyoxylic, mandelic, and hippuric acids as indices of styrene exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 42:11–19.

ONU. 2015. Informe de las Naciones Unidas sobre los Recursos Hídricos en el Mundo. Agua para un mundo sostenible. División de Ciencias del Agua. UNESCO. Italia

Palma, R. y Morales, S. 2011. Derecho al agua Retos y perspectivas Acceso a la justicia en la contaminación de ríos de México. El Salto Jalisco y el Atoyac Puebla. Centro Atoyac Zahuapan y Calidad de Vida S. C. y de Un Salto de Vida A. C., Instituto Nacional de Desarrollo Social (INDESOL). 1era edición.

Papadakis, E., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Makris, C., Papadopoulou-Mourkidou, E. 2015. A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 116: 1–9

Pemble, S., Klaus T.R., Sharon S., Spencer, R., Meyer, D., Hallier, E., Hermann, M. Bolt, R., Ketterer, B., Taylor, J. 1994. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism *Biochem. J.* 300: 271-276

Pérez, M.R., Castro, H., Gonsebastt, M., Rubio, J. 2008. Polymorphism of CYP1A1\*2C, GSTM1\*0 AND GSTT1\*0 in mexican population: a similitude analysis. *Human biology* 80: 475-465

Phuc, H., Kido, T., Dung Manh, H., Thai Anh, L., Phuong, O., Okamoto, R., Ichimori, A., Nogawa, K., Suwazono, Y., Nakagawa, H. 2016. A 28-year observational study of urinary cadmium and  $\beta$ 2-microglobulin concentrations in inhabitants in cadmium-polluted areas in Japan. *J. Appl. Toxicol.* 36: 1622–1628

Piao, Y.F., Li, J.T., Su, Y. 2003. Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P420IIE1 and fatty liver. *World J. Gastroenterology* 9: 1214-2612

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302

Q, H., Wang, L., Zhang, J., Lu, F., Gong, W., Pan, J., Zhong, J., Hu, R., Yu, M. 2018. CYP2E1 and GSTM1 gene polymorphisms, environmental factors, and the susceptibility to lungcancer. *J Clin Lab Anal.* 31:e22403. doi: 10.1002/jcla.22403.

Qian, D., Dominic. F.I., Zanobetti, A., Schwartz, J. 2016. A National Cohort Study of Effects of PM2.5 and Ozone at Low Concentrations on Mortality In the Continental United States. En: Abstracts of the 2016I Epidemiology (ISEE). Abstract O-001. Research Triangle Park, NC:Environmental Health Perspectives.

Rappaport, S.M., Kim, S., Lan, Q., Li, G., Vermeulen, R., Waidyanatha, S., Zhang, L., Yin, S., Smith, M.T., Rothman, N. 2010. Human benzene metabolism following occupational and environmental exposures. *Chem Biol Interact* 184:189–195.

Riechelmann, H. 2004. Cellular and molecular mechanisms in environmental and occupational inhalation toxicology. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 3 Doc02

Ross, D. y Siegel, D. 2017. Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. *Front. Physiol.* 8:595. doi: 10.3389/fphys.2017.00595

Saldaña, F.P. y Gómez, B.M. 2006. Caracterización de fuentes puntuales de contaminación en el río Atoyac, México. Mem. XXX Cong. Interam. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 26 -30 Punta del Este, Uruguay.

San Sebastián, M. y Hurtig, A.K. 2004. Cancer among indigenous people in the Amazon basin of Ecuador, 1985–2000. *Rev Panam Salud Publica.* 16(5):328–33.

San Sebastián, M., Armstrong, B., Córdoba J.A., Stephens, C. 2001. Exposures and cancer incidence near oil fields in the Amazon basin of Ecuador. *Occup. Environ. Med.* 58: 517-522

Sandoval, V., Pulido, F., Monks, S., Gordillo, M., Villegas, V. 2009. Evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de la degradación ambiental del río Atoyac, México. *Interciencia.* 34(12): 880-887

Smith, T., Guyton, K.Z., Gibbons, C.F., Fritz, J.M., Portier, C.J., Rusyn, I., DeMarini, D.M., Caldwell, J.C., Kavlock, R.J., Lambert, P.F., Hecht, S.S., Bucher, J.R., Stewart, B.W., Baan, R.A., Coglian, V.J., Straif, K. 2016. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives.* 124(6) <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1509912>.

- Snyder, R. 2007. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan Human & Experimental Toxicology 26: 687–696
- Sorek-Hamer, M., Just, A.C., Kloog, I. 2016. Satellite remote sensing in epidemiological studies. *Curr Opin Pediatr* 28: 228–34.
- Sosa, R.E., Bravo, A., Mugica, A., Sanchez, A., Bueno, L., Krupa, S. 2009. Levels and source apportionment of volatile organic compounds in southwestern area of Mexico City. *Environ Pollut.* 157: 1038-1044.
- Stassen, J.M., Preeker, N., Ragas, M.J., Van, de Ven, W.P., Smolders, J.P., Poeleveld, N. 2012. Metal exposure and reproductive disorders in indigenous communities living along the Pilcomayo River, Bolivia. *Science of the Total Environment* 427–428, 26–34
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J. and Marra, M.A. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences (NQO1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(26): 16899-16903
- Tachachartvanich, P., Sangsuwan, R., Ruiz, H.S., Sanchez, S.S., Durkin, K.A., Zhang, L., Smith, M.T. 2018. Assessment of the endocrine-disrupting effects of trichloroethylene and its metabolites using in vitro and in silico approaches. *Environ Sci Technol* 52:1542–1550.
- Tibshirani, R. 1996. Regression shrinkage and Selection via the Lasso. *J R Stat Soc Series B Methodological* 58:267–288.
- Traver, R.D., Siegel, D., Beaul, H.D., Phillips, R.M., Gibson, N.W., Franklin, W.A., Ross, D. 1997. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *British Journal of Cancer* 75(1): 69-75
- US-EPA. 2012. Integrated Risk Information System on Benzene. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, D.C. Disponible: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/benzene.pdf> Accessed June 2017.
- Vaught, J.B. y Henderson, M.K. 2011. Biological sample collection, processing, storage and information management. En: Rothman N, Hainaut P, Shulte P, Smith M, Boffeta P and Perera F (eds). *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. Capítulo. 3: 23 – 42. WHO-IARC, Lyon, Francia, 2011.
- Verkasalo, P.K., Kokki, E., Pukkala, E., Vartiainen, T., Kiviranta, H., Penttinen, A., Pekkanen, J. 2004. Cancer risk near a polluted river in Finland. *Environ. Health Perspect* 112(9): 1026–1031.
- Versonnen, B.J., Arijs, K., Verslycke, T., Lema, W., Janssen, C.R. 2003. In vitro and in vivo estrogenicity and toxicity of o-, m-, and p dichlorobenzene. *Environ Toxicol Chem* 22:329–335.
- Vineis, P. y Garte, S. 2008. Biomarker validation. En: Wild C, Vineis P y Garte S (eds.) *Molecular Epidemiology of Chronic Diseases*. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England. Capítulo 6.
- Vineis, P., Malats, N., Boffeta, P. 1999. Why study metabolic susceptibility to cancer? En *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*, W. Ryder, IARC Scientific publication No. 148. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Vogel, U. 2011. Polymorphisms and gene-environmental interactions in environmental cancer. Pp 631-639 in reference module in earth systems and environmental sciences encyclopedia of environmental health.
- Wahner, A., Glatt, C., Brostein, J., Ritz, B. 2007. Glutathione S-transferase Mu, Omega, Pi, and Theta class variants and smoking in Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 431: 274-278.
- Wang, J.S. y Groopman, J.D. 2011. Physical/chemical/immunologic analytical methods. En: Rothman N, Hainaut P, Schulte P, Smith M, Boffetta P and Perera F. *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. IARC, Lyon, France.
- Watanabe, N., Dale, A.D. Rui-Ming Liu y Henry Jay Forman. 2004. Quinones and Glutathione Metabolism, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, VOL. 378
- WHO. 2016. Ambient air pollution: a global assessment of exposure and burden of disease. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250141/1/9789241511353-eng.pdf?ua=1> (aceso abril 17, 2017)

Wong, N.A., Rae, F., Simpson, K.J., Harrison, D.J. 2000. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in White population: a study and literature review, including meta-analysis. *Journal of clinical pathology: Molecular Pathology* 53: 88-93

Yard, E., Bayleyegn, T., Abebe, A., Mekonnen, A., Murphy, M., Caldwell, K., Luce, R., 2015. Metals exposures of residents living near the Akaki River in Addis Ababa, Ethiopia: a cross-sectional study. *J Environ Public Health*. 935297

Yerena, C., Hernández-Kelly, C., Ramírez, J., Riaño, M., López, M., Fernández, S., Ortega, A. 2005. Influencia del polimorfismo del CYP2E1 sobre el riesgo de intoxicación aguda por exposición a plaguicidas. *MG* 30(3): 68-75

Yu, M., Tsunoda, H., Tsunoda, M. 2011. *Environmental toxicology, biological and health effects of pollutants*. CRC Press 3er edición, 181-185

# **11 ANEXOS**



- **Anexo I**

**Volatile Organic Compounds in air: sources, distribution, exposure and associated illnesses in children.**

## REVIEW

# Volatile Organic Compounds in Air: Sources, Distribution, Exposure and Associated Illnesses in Children

Regina Montero-Montoya\*, Rocío López-Vargas\* and Omar Arellano-Aguilar†

**Background:** Toxic volatile organic compounds (VOC), like benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX), are atmospheric pollutants representing a threat to human health. They are released into the environment from mobile sources in urban settings, but newly polluted areas are gaining importance in countries where accelerated industrialization is taking place in suburban or rural settings.

**Methods:** The review includes studies done in Mexico and Latin-America and countries considered to have emerging economies and are compared with similar studies in developed countries. Data about environmental VOC levels and exposure of children have been included. Also, information about health effects was reviewed. Articles were searched in PubMed and Scopus, and information was also obtained from the United States Environmental Protection Agency (EPA), the EPAs Integrated Risk Information System (IRIS-EPA) and state reports on air quality of Mexican cities.

**Results:** VOC or BTEX levels reported in industrial and suburban areas were found to be higher due to the burning of fossil fuels and waste emission; whereas, in big cities, VOC emissions were mainly due to mobile sources. Even though TEX levels were under reference values, benzene was found at levels several times over this value in cities and even higher in industrial zones. Elevated VOC emissions were also reported in cities with industrial development in their peripheral rural areas.

**Public health relevance:** Industrial activities have changed the way of life of small towns, which previously had no concern about environmental pollution and chemicals. No air monitoring is done in these places where toxic chemicals are released into rivers and the atmosphere. This work demonstrates the need for environmental monitors to protect human life in suburban and rural areas where industrial growth occurs without planning and ecological or health protection, compromising the health of new generations beginning in fetal development.

## Introduction

Environmental pollution is a significant problem for humanity because of considerable changes in ecosystem behavior and the loss of biodiversity it is triggering, and because it may be at the origin of different diseases and physiological disorders in humans. Pollutants that impact air quality include volatile organic compounds (VOCs), which are introduced into the atmosphere through anthropogenic or biogenic activities and add to problems in the formation of tropospheric ozone and particles lower than 2.5 micrometers in large cities [1].

VOCs as categorized by the World Health Organization (WHO) are compounds with a boiling point less than 250°C measured at a standard atmospheric pressure of 101.3 kPa [2]. This classification may be further subdivided into very volatile organic compounds with boiling points between 0 and 100°C, which are mainly gases, and volatile compounds with boiling points between 100 and 250°C,

distributed between air and water body surfaces or solid surfaces [3]. These compounds' physical and chemical properties and mean lifetime in the atmosphere, which ranges from a few minutes to several months, allow them to travel large distances from the source of emission and to enter the body, mainly by way of air or through the skin, and cause symptoms that may lead to pathologies, including asthma, atopic dermatitis and neurologic problems. Some VOCs, like benzene, 1,3-butadiene and vinyl chloride are classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in Group 1 as carcinogenic for humans [4].

Nevertheless, these data were obtained from occupational studies, so contribution to the aforementioned diseases by environmental exposure to VOCs is generally unknown, with the best documented being respiratory diseases caused by ozone [5]. VOCs, however, are important for global ecological integrity and human health [6] independently of their contribution to tropospheric ozone. In Mexico, information about VOC mixture in air is scarce, and the most widely studied sites are large cities, like Mexico City (MX), Monterrey (MY) and Guadalajara (GJ); industrial areas have been studied only in relation to aromatic VOC levels, such as benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX), as surrogates for the presence of VOC, because they result mostly from fuel combustion.

\* Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, MX

† Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, MX

Corresponding author: Regina Montero-Montoya, PhD  
([dorinda@biomedicas.unam.mx](mailto:dorinda@biomedicas.unam.mx))

Therefore, in this review we first compared VOC levels in the three above-mentioned cities as to their composition and levels. Next, we focused on identifying the value of BTEX in the environment in communities close to industrial facilities from which these substances may be released, and we focused on any relationships that may exist under child population exposure conditions. These data were used to make a comparison with occupational exposure reference values. The purpose of this review was to describe the information currently available about VOC toxic effects and VOC levels in our cities and their industrial areas so as to better understand the problems faced by communities more affected by these toxic substances.

## Methodology

Works between 2000 and 2017 were reviewed in PubMed and Scopus following searches with the key words volatile organic compounds, health, disease and oxidative stress. Also, the latest information from the EPA and IRIS was reviewed and information about BTEX was used as a model and summarized. Public records from the National Institute of Ecology and Climate Change (INECC in Spanish) were consulted for information about benzene levels in Mexican Cities.

## Results

### *Volatile organic compounds (VOCs)*

VOCs include aromatic hydrocarbons, aliphatics, aldehydes, ketones, ethers, acids and alcohols, with diverse functional groups (halogens, oxygen, sulfur, nitrogen or phosphorus, excluding carbon oxides and carbonates). They are rather inert lipophilic compounds capable of passing through biological membranes, with a toxicity that basically depends on their biotransformation within the body [7]. Although a large number of substances are considered VOCs, the most abundant in the environment are benzene and some of its organic derivatives, like toluene, ethylbenzene and xylene (*o*-, *m*- and *p*-), jointly named BTEX, which comprise over 60% of the VOCs found in urban areas [8]; hence, they are used as a reference to evaluate environmental levels and VOC exposure.

VOCs come mainly from natural sources, like forest fires and the transformation of biogenic precursors; nevertheless, anthropogenic activities have become important sources of toxic VOC emissions into the atmosphere, so much so that they account for 25% of VOCs in our global atmosphere [9]. Petroleum and natural gas extraction, petrochemical activities and the burning of fossil fuels in industries, homes and mobile sources, including automobiles, trucks, buses and motorcycles, ships and airplanes are the major contributors of VOC, followed by chemical and industrial processes (manufacturing of paints, lubricants, adhesives, oil derivatives), mining, commercial sources, gas leaks from stoves, residential water heaters and boilers and use of pesticides in agriculture [10, 11].

To determine the amount of pollutant emissions into the atmosphere, the US Environmental Protection Agency (EPA) developed the national emissions inventory (NEI), where a comprehensive and detailed estimate of air emissions of the most hazardous atmospheric pollutants and their precursors is made from different sources across its

territory [12]. Pollutants included in the NEI are associated with the national ambient air quality standards (NAAQS) and with the EPA's air toxic program, which include hazardous air pollutants (HAPs). NEI estimates of compounds include carbon monoxide (CO), lead (Pb), particulate material (PM), sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) and ozone precursors (O<sub>3</sub>), which are nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) and VOCs.

Regarding VOC emissions from industrial processes, the EPA reported in 2014 the activities with the highest VOC emissions into the atmosphere were oil and gas production, totaling more than 3 million tons that year, followed by storage and transportation, and new and existing chemicals (NEC) with nearly 200 thousand tons in both cases; whereas, oil refineries emitted just over 50 thousand tons [13]. It is worth mentioning that these figures account for only the United States, and so it is of concern that not all countries have reliable air pollution emission inventories, because despite the existence of the Global Atmosphere Watch (GAW), it monitors only VOCs present in large geographic areas, not at a regional municipal level, where health impacts occur.

**Table 1** presents VOC pollution compositions and levels from a study on air quality in major cities in Mexico [14–16]. In MX, the composition is due to liquified gas, automobile and truck fuel combustion and the use of household products of industrial origin besides fuel combustion. In MY, a substantial contribution of compounds of industrial origin besides fuel combustion is observed; levels reached in the most polluted area in MY (Santa Catarina) are about twice the highest levels measured in MX (La Merced): 1051 ppbV versus 605.5 ppbV [14, 15]. GJ shows an intermediate combined composition of industry, gas and use of industrial products, with a total of 678.04 ppbV average [16].

The relative abundance of reactive VOCs that contribute to the formation of tropospheric ozone in MY and MX was studied [14, 15], and it was found that the potential for ozone formation in the most polluted industrial area in MY was four times higher (**Table 2**) than the potential in the most polluted area in MX. Nevertheless, measurements in 2015 indicated higher ozone levels in MX (50 to 80 ppb during the ozone generation period, from March to June, with a maximal value of 179 ppbV in June, at the south of the City), which is probably because the natural atmosphere in MX is very oxidative and UV radiation is high [17]. MY showed ozone levels between 20 and 36.6 ppbV on average throughout the year, with a maximum 46 ppbV in August in its NW area [18]. According to the EPA's air quality indices (AQI) for ozone, MY shows good indices; whereas, MX shifts between moderate to harmful for sensitive groups values [19].

### *Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (o-, m- and p-) (BTEX), as indicators of toxic VOC exposure*

Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (*o*-, *m*- and *p*-) are found in natural form in crude oil, diesel and gasoline, so they are released into the environment whether or not these fuels are burned. In addition, BTEX are highly used in the industry as additives and precursors of other substances: benzene is used in the manufacturing of synthetic materials and consumer products, including plastics,

**Table 1:** VOC mixture in the air of the largest cities in the Mexican Republic.

VOC	Monterrey [15]			Guadalajara [16]			México [14]		
	Origin/use	Maximal VOC ppbV	VOC	Origin/use	Maximal VOC ppbV	VOC	Origin/use	Maximal VOC ppbV	
1 Ethanol	Industrial/fuel combustion	150	Propane	LP gas	160	Propane	LP gas	28	
2 Propane	LP gas	150	Methylcyclopentane	Industrial	70	Acetone	Domestic product	17	
3 2-hexanone	Industrial	105	n-butane	LP gas	38	Ethanol	Fuel combustion	15	
4 Acetone	Industrial	60	Acetone	Domestic use	30	n-butane	LP gas	15	
5 4-methyl-2-pentanone	Industrial/domestic product	40	Ethanol	Fuel combustion	30	Toluene	Fuel combustion	8	
6 2-propanol	Industrial/domestic products	35	2-hexanone	Industrial	30	n-pentane	Fuel combustion/domestic product	10	
7 Hexachloro-1,3-butadiene	Industrial	35	2-propanol	Industrial/domestic product	25	Isopentane	Fuel combustion/domestic product	8	
8 1,4-dichlorobenzene	Industrial	30	Toluene	Fuel combustion/domestic product	20	n-hexane	Fuel combustion	6	
9 1,2,4-trimethylbenzene	Fuel combustion/industrial	30	Isobutane	LP gas	18	Ethylene	Domestic product/fuel combustion	5	
10 n-butane	LP gas	30	4-methyl-2-pentanone	Industrial/domestic product	18	Isobutane	LP gas	5	
TOTAL VOC	Santa Catarina area	1051	TOTAL VOC	Average Whole City	678.04	TOTAL VOC	La Merced area	605.5	

TOTAL VOC – refers to the sum of all VOC measured; in the table, only the ten more abundant are presented.

**Table 2:** Potential contribution of VOC to ozone formation according to their MIR\* factors in Monterrey and Mexico City.

Monterrey (Santa Catarina area) [15]		Mexico City (La Merced area) [14]	
VOC	Potential ozone formation (ppbV)	VOC	Potential ozone formation (ppbV)
Ethanol	233.5	Toluene	72.8
Acrolein	132	o-xylene	42.8
Methyl-metacrylate	108.7	Ethanol	21.4
Toluene	101.0	Propylene	21.2
Propylene	82	Ethylene	20.8
1,2,4-trimethylbenzene	79.5	1,2,4-trimethylbenzene	17.5
o-xylene	79.4	m-xylene	14.5
m-xylene	78.4	n-hexane	11.9
p-xylene	71.8	Isopentane	11.7
1-pentene	64.9	n-butane	11.5
4-methyl-2-pentanone	59.2	1,3,5-trimethylbenzene	9.7
Propane	57.8	1,3-butadiene	9.7
Naphthalene	55.7	Propane	8.9
1,3,5-trimethylbenzene	50.9	p-xylene	8.7
n-hexane	50.3	Ethylbenzene	7.7
<b>TOTAL POF</b>	<b>1,305.1</b>	<b>TOTAL POF</b>	<b>290.8</b>

\*Maximum Incremental Reactivity.  
POF – potential ozone formation.

**Table 3:** Concentrations of BTEX in different studies ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ).

*Benzene $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Toluene $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Ethylben- zene $\mu\text{g}/\text{m}^3$	o-xylene $\mu\text{g}/\text{m}^3$	m, p-xylene $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Country	Type of measurement	Reference
<b>1.21</b>	14.33	2.55	2.16	5.97	USA population	Personal exposure	[66]
0.63	1.09	0.32	0.26	.	Canada	Outdoor levels	[67]
0.78–0.88	.	.	.	.	Stenungsund, Sweden, Petrochemical area	Outdoor levels	[68]
<b>2.15</b>	6.83	1.28	1.46	3.56	USA population	Outdoor levels	[21]
<b>3.64</b>	19.2	2.78	2.87	8.07	USA population	Personal exposure	[21]
<b>1.5–6.95</b>	7.17–26.9	0.59–2.06	0.94–4.16	3.07–13.3	Review of studies in the world	Outdoor levels	[10]
<b>1.21–2.8</b>	14.33	2.55	2.16	5.97	Review of studies in the world	Personal exposure	[10]
<b>15.07</b>	139.35	24.68	13.39	27.88	Kwai Chung in Hong Kong industrial area	Outdoor levels	[8]
0.7–3.5	2.3–6.0	0.4–5	.	1.9–2.3	Viseu, Portugal	Outdoor levels	[40]
<b>13.42</b>	18.9	1.8	2.3	10.91	La Plata industrial area, Argentina	Outdoor levels	[69]
0.58–3.0	2.8–5.9	0.2–1.6	0.26–1.3	1.3–3.5	Curitiba, Brazil, suburban area	Outdoor levels	[70]
0.58–6.0	4.3–73	0.19–2.5	0.24–45	1.3–6.9	Curitiba, Brazil, suburban area	Personal exposure	[70]
<b>5.9</b>	37.9	5	5.9	14.9	Mexico City	Outdoor levels	[24]
<b>10.6</b>	86.1	8.1	9.1	25.2	Mexico City	Personal exposure	[24]
<b>2.18–3.7</b>	17.17–46.9	2.4–7.2	2.8–11.3	3.8–11.7	Mexico City	Outdoor levels	[17]
<b>1.1–5.3</b>	2.3–14.0	0.4–2.2	0.5–3.2	1.4–8.0	Industrial area, Tlaxcala, Mexico	Outdoor levels	[74]
0.03	5	1	0.1	0.1	USA	Outdoor levels	Rfc ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) [71]
1.01	6.95	1.5	1.5	4.1	Global	Personal exposure	** $\mu\text{g}/\text{m}^3$

\* Bold numbers in the benzene column represent increased risk of leukemia for those populations.

\*\* Lowest concentrations found to produce health effects [10].

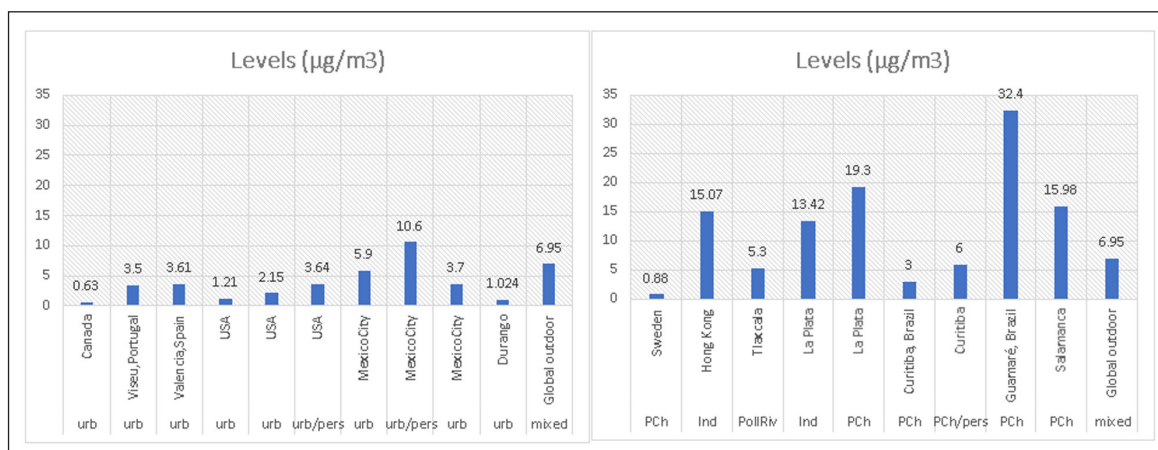
nylon, insecticides and paints; toluene is used as solvent for paints, coatings, rubbers, oils and resins; ethylbenzene may be found in paints, plastics and pesticides, and it is also used as additive for aviation fuel; xylenes are used as solvent in the printing, rubber and leather industries [20, 12].

Because BTEX are so widely used and are derived from gasoline and organic material combustion, they coexist as a mixture in the atmosphere in practically all ecosystems. The mixture composition varies and depends to a great extent on nearby sources, on the type of industry, on the activities developed in the region and on environmental conditions. These compounds may be found polluting not only the air but also the soil and the water, because, as already mentioned, their physical and chemical properties endow them with a great dispersion capacity, and once they are released into the environment, they can volatilize, dissolve in water, adhere to soil particles or be biologically degraded [21, 10]. High BTEX concentrations have been found in areas with intensive industrial activity, but they also reach high levels in large cities, mostly owing to vehicular traffic problems [22, 21]. Furthermore, there may be additional exposure owing to household products, like disinfectants, aerosols, varnishes, printing inks [23], as well as cigarette smoke, which turns them into ubiquitous pollutants. Higher BTEX concentrations have been reported in close spaces (i.e., indoors) than in open

spaces [10], but the ban on indoor smoking and more careful measurements [24, 21] have demonstrated that personal exposure to VOCs may be due to outdoor pollutants, mainly in temperate and warm latitudes where doors and windows are opened more frequently, allowing for an air exchange. In MX, only toluene showed higher levels indoors than outdoors (26.11 ppbV vs 14.32 ppbV) [24].

For different polluting compounds in environmental matrices, the EPA has used information from the IRIS database to establish reference concentrations (RfCs) that cause critical effects [25]. Hence, the maximum environmental exposure concentration in air of benzene for an individual is  $0.03 \text{ mg}/\text{m}^3$ ; this concentration is due to the hematological effect of benzene in humans. For toluene, it is  $5.0 \text{ mg}/\text{m}^3$ , based on neurological effects in humans and the increase in liver size. For ethylbenzene, it is  $1.0 \text{ mg}/\text{m}^3$  based on effects in the respiratory system, hepatotoxicity and nephrotoxicity. For xylene mixture, a maximum concentration in air of  $0.1 \text{ mg}/\text{m}^3$  was estimated for effects on the respiratory and neurological systems and low birth weight (Table 3, bottom) [25]. All of the above refers to noncarcinogenic effects. Nevertheless, according to the monograph on specific reference values for benzene, an individual's chronic exposure to a reference value of  $0.03 \text{ mg}/\text{m}^3$  accounts for an increase in the potential risk for developing leukemia to 1 out of 10,000,





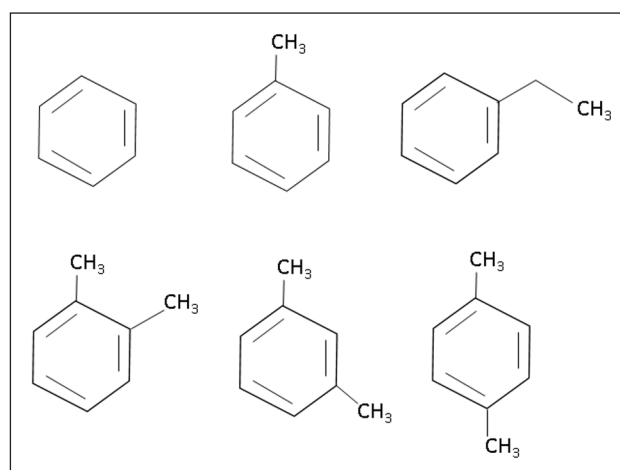
**Figure 1:** Highest levels of benzene reported in urban and industrial areas, both in developed and developing countries. Notice the extraordinary low levels reported in urban Canada (left panel) and industrial Sweden (right panel). Industrial areas in Latin America are not continuously monitored for air quality, only great cities, but children and pregnant women live in these places where pollution is generally high. Urb-urban; pers-personal; PCh-petrochemical zone; Ind-industrial zone; PollRiv-polluted river.

compared with a baseline of 1 in one million for a population with exposures 2 orders of magnitude lower [25].

**Table 3** also shows environmental exposure levels measured in research studies of populations near BTEX sources, like industrial areas, refineries and a highly polluted Mexican river. In all these cases, the reported concentrations were lower than RfCs set forth by the EPA for noncarcinogenic effects. However, most data reported about benzene—the only carcinogenic compound—are near or above the inhalation unit risk (IUR) value of  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in the air, increasing an individual's cancer risk by  $2.2 \times 10^{-6}$  up to  $7.8 \times 10^{-6}$  for being exposed for a lifetime. For example, the  $15.07 \mu\text{g}/\text{m}^3$  value reported by Lee [8] would increase the cancer risk for that population 100 times [25]. As can be observed, industrial areas in emerging economies, like Latin-American countries and Hong Kong, show the highest levels of benzene, demonstrating that economic growth and development are not related to environmental protection and health or well-being (Figure 1).

**Biotransformation mechanisms and health effects of BTEX**  
 BTEX compounds (Figure 2) are aromatic hydrocarbons derived from benzene; the toluene and ethylbenzene rings are monosubstituted with a methyl group and an ethyl group, respectively; the xylene ring is disubstituted with methyl groups, so that the xylene mixture comprises ortho-, meta- and para- (o-, m- and p-) compounds, according to the position of the ring substituents [26]. Because of these structures and their easy volatilization, they can enter organisms through various routes: the most common is inhalation, followed by skin and, at a lower percentage, orally through polluted water or food.

Toxicokinetic studies in humans and animals indicate that these lipophilic chemical products are distributed to highly vascular tissues rich in lipids, like the brain, the bone marrow and the body fat, and they are rapidly eliminated from the body. Nevertheless, such lipophilicity confers on them the capability to cross mucous epithelia of the respiratory tract and the cell membranes in various

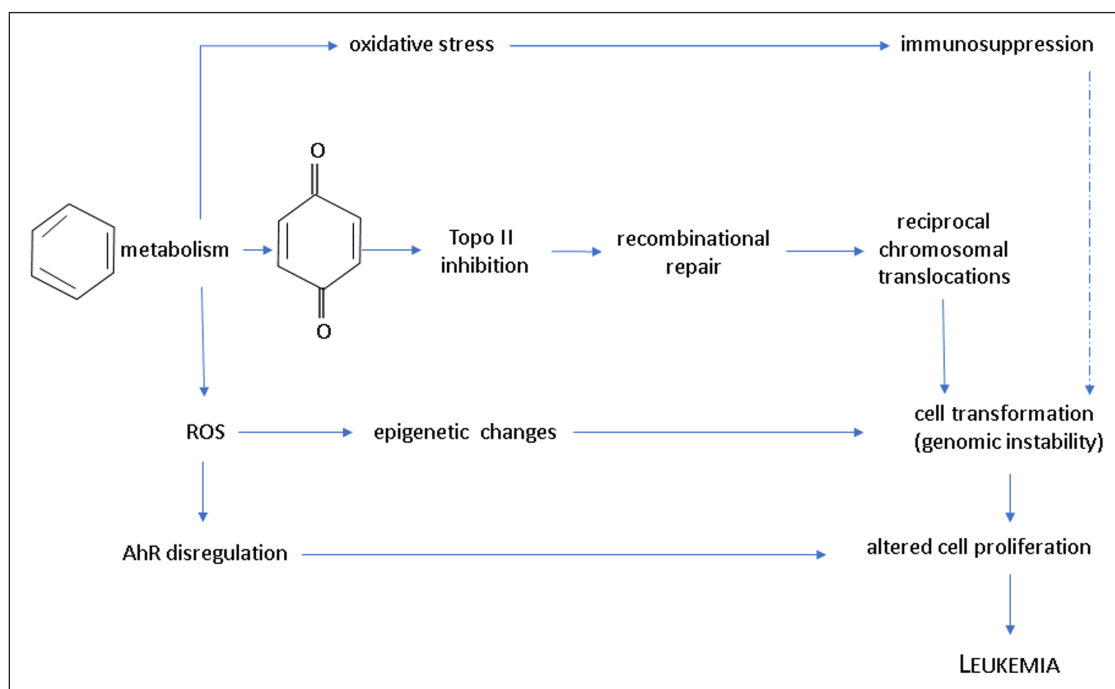


**Figure 2:** Chemical structure of BTEX. Upper line: benzene, toluene and ethylbenzene. Lower line: ortho-, meta- and para-xylene.

organs. The nose mucous epithelium and the tracheo-bronchial tree are metabolically active to BTEX exposure, although the liver is the organ with the highest activity, because most xenobiotic biotransformation processes take place in the liver [27].

BTEX are slightly reactive compounds, so their toxicity is determined by their biotransformation within the body [7]. Biotransformation comprises phase I and phase II processes.

Classical studies about BTEX biotransformation, like the toxicological profile for total petroleum hydrocarbons [28], considered that out of the four compounds, benzene has the highest toxicity potential because the formation of an epoxide was recognized from the oxidation of the benzene molecule by CYP2E1 action. However, more recent studies, such as those presented by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), reevaluated the joint toxic action of these chemicals, and now it is known that at low exposure concentrations BTEX are substrates of CYP2E1 and of other P450 isoenzymes, whose main function is to oxidize their substrates. Oxidized metabolites of



**Figure 3:** Probable pathways of benzene leukemogenic activity. These events might take place either in the fetal liver or in the infant bone marrow, or in both, to produce childhood leukemia (based on [10, 56]).

this phase I reaction are highly reactive [20]. Furthermore, the action of compounds has a competitive metabolic inhibition mechanism, but only at high exposure levels; such mechanism has not been found at low levels. Hence, it was concluded that the biotransformation of the four substances is dose-dependent and generally extensive at dose levels that do not saturate the first metabolic step of each compound [29, 20].

All four chemicals can produce neurological impairment via parent compound-induced physical and chemical changes in nervous system membranes. Additionally, exposure to benzene can cause hematological effects, including aplastic anemia, with subsequent manifestation of acute myelogenous leukemia via the action of reactive metabolites [30, 20].

Benzene, mainly during its metabolism, may suffer a nonenzymatic rearrangement and form phenol, which by a second CYP2E1-mediated oxidation turns into hydroquinone. This may be accumulated in the bone marrow and act as a substrate of myeloperoxidase (MPO), forming benzoquinone that is both myelotoxic and clastogenic [31]. Its leukemogenic capacity has partly been attributed to this mechanism (Figure 3). It has been determined that benzene may suffer biotransformation in the bone marrow, but in a lower quantity compared to the liver, although the typical toxicity site of this compound is the bone marrow [32, 33]. At low doses, benzene turns into recognized toxic metabolites that include benzene epoxide or oxide, benzene dihydrodiol, hydroquinone, catechol, benzoquinones and muconaldehyde, while at a high dose, benzene inhibits hydroquinone formation from phenol, apparently through competition for the CYP2E1 active site, which also has an affinity for hydroquinone and catechol [31, 33]. This is important because environmental exposure to benzene typically occurs at very low doses.

The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) [34] made recommendations for the occupational biological exposure index (BEI®) in urine specimens for workers at industries producing environmental pollutants. In 2005, they recommended the use of certain metabolites to determine exposure to benzene and toluene, establishing that trans, trans-muconic acid (t,t-MA) was a good biomarker of benzene exposure with a BEI® of 500 µg/g of creatinine; for toluene, they established hippuric acid (HA) as an exposure biomarker with a BEI® of 1.6 g/g of creatinine. Table 4 shows levels found in children in various studies outside the working and industrial environments in Latin-American countries and in areas with similar pollution problems. As pointed out by Bolden et al. [10], levels found are generally lower than those set forth in international reference values, like the US-EPA or ACGIH, for occupational exposure, but effects on health or on the measured biomarker are reported.

Tuakuila et al. [35] used S-phenylmercapturic acid (S-PMA) to measure benzene exposure. This metabolite was proposed by the ACGIH in its 2015 publication as the best benzene exposure biomarker [36], which had rendered previous levels measured by t,t-MA questionable. However, Fang et al. [37] demonstrated that there is a good correlation between the two metabolites in experimental animals and in children exposed to benzene in an industrial area in Korea.

#### **BTEX and their relationship to diseases in children**

Due to the interaction of metabolites resulting from biotransformation of compounds with macromolecules, one can assume that systems will be affected in different ways, contributing to the development of a diversity of diseases, of which a vast collection of research has been carefully reviewed by Bolden et al. [10] They reached the impor-

**Table 4:** VOC exposure and health effects in children.

VOC studied	Place	Biomarker	Age	Health effects	Exposure concentrations	Reference
Benzene	Valencia, Spain, big city	Home outdoor and indoor levels	Infants	No conclusive relationship with respiratory illness was found	Outdoor levels: 0.5–3.61 µg/m <sup>3</sup> , i/o ratio: 0.3–26.08 µg/m <sup>3</sup> (highest in winter)	[72]
BTEX, and other 37 VOC	Genoa, Italy, with petrochemical industry away from residential zone	Home outdoor levels	6–10 years old	BTEX did not differ between zones. Higher risk of respiratory syndromes and absenteeism in children living in the industrial zone	114.4 µg/m <sup>3</sup> of total VOC in the industrial area vs. 80.7 µg/m <sup>3</sup> in the residential area. Respiratory effects are attributed to o-xylene	[44]
Benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and formaldehyde	Viseu, Portugal, nonindustrial city	Forced expiratory volume (FEV), forced vital capacity (FVC). VOC levels indoors and outdoors	7.3 ± 1.1 years old	Toluene levels, ethylbenzene and benzene exposure increases were associated with the need for medical intervention related with wheezing	0.5–39.2 µg/m <sup>3</sup> benzene levels in a year; 3.3–108.2 µg/m <sup>3</sup> toluene levels; 0.6–60.6 µg/m <sup>3</sup> ethylbenzene levels; 2.1–185.6 µg/m <sup>3</sup> xylenes levels in a year	[40]
Benzene, toluene, xylenes, NO <sub>2</sub>	Guamaré, Rio Grande do Norte, Brazil. City with petrochemical industry	Air quality monitoring station and respiratory symptoms in children	0–14 years old	VOC were under acceptable levels. Significant associations were found between wheezing and the homes closer to highest VOC levels in air	Benzene levels 32.4 µg/m <sup>3</sup> ; Toluene levels 18.8 µg/m <sup>3</sup> ; Xylenes levels 18.1 µg/m <sup>3</sup>	[43]
BTEX and other VOC, alkanes and cycloalkanes	La Plata, petrochemical zone compared to heavy traffic and nonpolluted areas	Forced expiratory volume (FEV), forced vital capacity (FVC). VOC levels outdoors	6–12 years old	Children in the petrochemical area showed significantly more respiratory problems during the winter season, including asthma	Benzene levels 19.3 µg/m <sup>3</sup> ; Toluene levels 19.1 µg/m <sup>3</sup> ; Xylenes levels 9.6 µg/m <sup>3</sup> ; Total VOC levels 102.1 µg/m <sup>3</sup>	[42]
Benzene, toluene	Guangzhou, China, industrial city	8-OHdG, <i>t,t</i> -muconic acid ( <i>t,t</i> -MA), dihydroxybenzene, <i>s</i> -phenylmercapturic acid (S-PMA), <i>s</i> -benzylmercapturic	3–6 years old	Co-exposure to benzene and toluene, plus HAP, induces additional DNA damage	Levels of <i>t,t</i> -MA: 2.6 to 381.16 µg/g creatinine; sum of all toluene and benzene metabolites: 25.09 to 1175.15 µg/g creatinine	[51]
Benzene	Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Urban area	Phenylmercapturic acid (S-PMA) in urine	1–5 and 6–14 years	S-PMA levels are 10X higher than those reported for Canadian kids. A level of 7.0 µg/L in urine is proposed as a reference value	S-PMA level of 7 µg/L urine was found as a geometric mean in children aged 6 to 14 years old	[35]
Benzene, toluene	Coatzacoalcos, Veracruz, México. Petrochemical and oil refinery city	<i>t,t</i> -muconic acid ( <i>t,t</i> -MA) and hipuric acid (HA) in urine. Comet assay and hematologic parameters	6–12 years old	Toluene and benzene metabolites did not exceed occupational levels. <i>t,t</i> -MA inversely correlated with hematocrit and hemoglobin values, as well as with red cell count	44–5521 µg/g creatinine of <i>t,t</i> -MA; 0.03–2.12 g/g creatinine of HA	[50]

(contd.)



VOC studied	Place	Biomarker	Age	Health effects	Exposure concentrations	Reference
Benzene	Two urban-industrial areas in Buenos Aires, Argentina	<i>t,t</i> -muconic acid and benzene in air	7–11 years old		<i>t,t</i> -MA 48.6 to 1367.8 µg/g creatinine, and benzene levels of 0.04 to 0.49 mg/m <sup>3</sup>	[49]
Benzene, toluene	San Luis Potosí, México. Urban area	<i>t,t</i> -muconic acid and hipuric acid in urine	9.5 ± 4.0 (6–13.5) years old		<i>t,t</i> -MA levels of 35 to 850 µg/g creatinine; HA levels of 0.1 to 1.75 g/g creatinine. Under reference values for both exposures	[53]
VOC	San Luis Potosí, México. Indigenous communities close to polluted rivers in a rural neglected area	<i>t,t</i> -muconic acid and 1-hydroxypyrene in urine	Children aged 7.5 ± 1.5 years old		<i>t,t</i> , MA: 38.4–4334 µg/g creatinine; 1-OHP: 0.02–94.1 µmol/mol creatinine;	[52]
VOC of industrial and mobile sources	Atoyac River in Central México	Forty-two sampling stations in six zones along the river	All the population living in a strip of two kilometers measured from the banks of the river	They conclude that the loss of ecological equilibrium in the basin represents an immediate and future health risk for inhabitants on the banks	Concentrations were not disclosed; however, the river does not sustain macroscopic life	[73]
BTEX	Global-42 studies from around the world and several settings: industrial, urban, rural	Air levels, indoor, outdoor, personal and urinary metabolites	Prenatal to senescence	Developmental, immune function, reproductive, respiratory, hematological, cardiovascular disease	BTEX levels under reference values established by EPA	[10]

As a reference, ACGIH has recommended the following BEI for BTEX in occupational environment: benzene, S-PMA – 25 µg/g creatinine, *t,t*-MA – 500 µg/g creatinine; toluene, hippuric acid – 1.6 g/g creatinine, *o*-cresol – 0.3 mg/g creatinine.

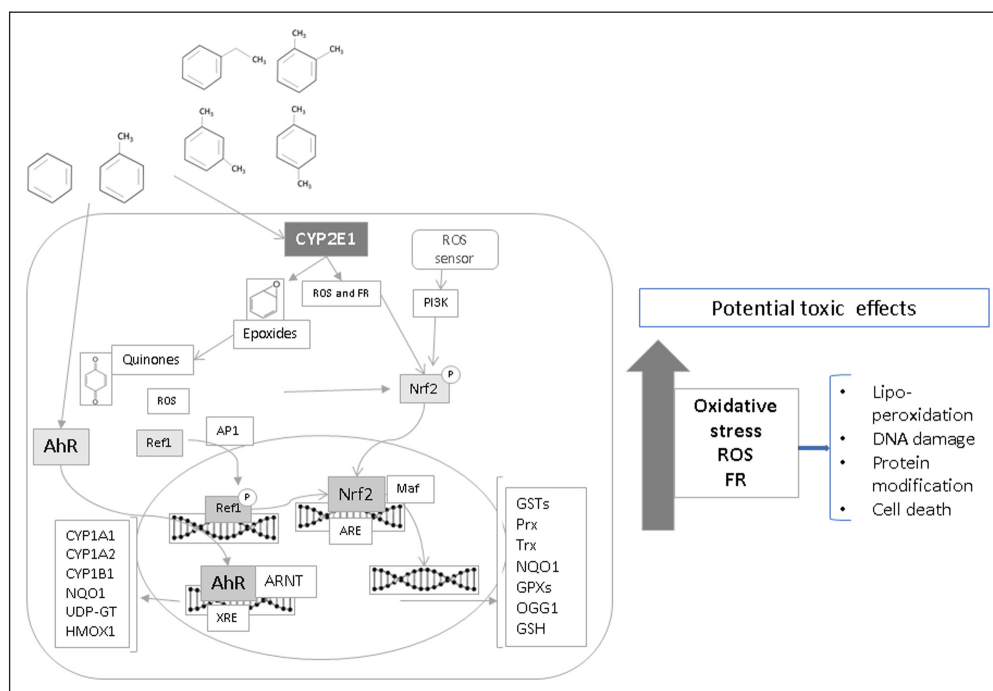
tant conclusion that even though environmental levels of these compounds are below reference levels, they cause various diseases because of the known characteristics of each BTEX component. BTEX are distributed to the central nervous system, the bone marrow and highly vascular tissues rich in lipids and are biotransformed both in the respiratory system and in the liver [38–41], where biotransformation can generate different endpoints of toxicity at the cellular level (**Figure 3**).

Studies on environmental exposure largely found a relationship with diseases such as asthma and respiratory complications (**Table 4**) [40, 42–44]. Studied populations are located close to a source of BTEX, including industrial complexes, petrochemical facilities or refineries or large cities.

A study was conducted on children in elementary schools, one near a refinery and the other in an area far from the petrochemical complex. A relationship was observed between respiratory syndromes and resulting absenteeism and BTEX levels, and a significant difference was found in *p*-, *m*-xylenes concentration, which was greater in the area close to the refinery and correlated with sore throat, cough and cold in the children within the community [44].

Another study estimated concentrations of VOCs, including benzene, toluene and ethyl-benzene, with daily activity patterns in a sample of school age children in a nonindustrial area. This study was correlated with measurements of the forced expiratory volume (FEV) and the forced vital capacity (FVC), with the use of spirometric tests to identify respiratory capacity problems, and it found that the increase in total exposure was significantly associated with a decrease in FEV. Consequently, they suggest that this type of exposure may be related to the occurrence of asthma [40].

Lopes de Moraes et al. [43] found an association between wheezing and the levels of VOC at home; whereas, Wichman et al. [42] found more respiratory problems during the winter season. Similar results were seen in elderly people when looking for associations between the loss of pulmonary function measured by FEV and FVC tests and BTEX exposure measured through BTEX metabolites in urine, and the results were correlated with oxidative stress biomarkers (MDA, TBA, 8-OHdG), demonstrating that exposure to toluene and xylene has harmful effects on pulmonary function and that oxidative stress could be involved in the pathogenesis of this population [39].



**Figure 4:** Oxidative stress, gene regulation and cytotoxic effects due to exposure to BTEX. ROS-reactive oxygen species; FR-free radicals. Prx – peroxiredoxin; Trx – thioredoxin; GPXs – glutathione peroxidase.

This result matches the result seen in a model of young rats that were simultaneously administered a dose of toluene, chloroform and methylene chloride for three days, which produced an increase in lipid peroxidation measured by TBARS, a loss in antioxidant capacity determined by SOD, glutathione peroxidase and glutathione reductase diminished activities, as well as an increase in CYP2E1 hepatic activity. Individual administration of each compound did not induce a significant response in the animals [45].

In this model, the liver and bone marrow were affected. All this is consistent with the reconstruction of events from different studies shown in **Figure 4**, which represents BTEX-induced effects of metabolism and antioxidant response, as well as possible cell-wide toxic effects. In their review of studies conducted on children and teenagers and at birth, Bolden et al. [10] presented the following as the main targets affected by these mechanisms: the respiratory system, the immune system, the reticuloendothelial tissue, the skin and the developing embryo.

## Discussion

While a large part of BTEX emissions into the atmosphere originate from biogenic processes, a considerable amount comes from anthropogenic sources that could be regulated more efficiently. In the European Union and the United States, VOC emissions have been reduced by regulating industrial processes, improving vehicle engines and reducing gasoline, solvents, paints and other sources. Nevertheless, reference concentrations (RfCs) developed by the EPA (**Table 3**) far exceed BTEX concentrations determined in all research presented in this review. RfCs are due to critical adverse effects caused by chronic exposure to pollutants. The last update of BTEX compounds was in 2012, and some references provided by the IRIS are before 1996.

This review has found many publications that associate concentrations below those used as reference for toluene, ethylbenzene and xylenes with illnesses classified as critical by the EPA-IRIS, including processes such as the increase in oxidative stress [39] that are precursor mechanisms of chronic diseases, such as cancer, and illnesses related to chronic inflammation, such as bronchitis [46], asthma [47] and atopy [48].

However, only six publications [35, 49–53] quantified BTEX metabolites in children's urine samples, and each one quantified different metabolites. Among them, Pelallo et al. [50] reported the highest levels of child exposure to benzene and toluene in three communities surrounded by petrochemical facilities in a tropical coastal region. Olmos et al. [49] reported high levels of exposure to benzene in the industrial area of a large capital city like Buenos Aires. The same results recur in similar studies on children living in polluted industrial areas in Korea [37] and Mexico. Children living close to industrial settings show higher levels of metabolites of benzene, which has been the most studied VOC as it is carcinogenic. Furthermore, Flores et al. [52] found a high level of exposure to benzene in children of a remote rural community crossed by a river polluted with industrial waste in a continental tropical zone. That the highest levels of benzene exposure were found in tropical areas could be due to the high temperatures, which allow the widest distribution of contaminants into the air.

It should be added that other carcinogenic VOCs were detected in MX: 1,3-butadiene and formaldehyde reach personal exposure levels that raise concerns about the health of exposed people [24].

Although the EPA-IRIS are collecting updated information for mixed and individual pollutants, countries that follow the guidelines thereof—criteria developed more than two decades ago—are still in use. This situation cannot be

allowed to continue given the amount of information about BTEX biotransformation. It is now known that as a result of BTEX exposure, the body may form a variety of metabolites, such as epoxides and benzoquinones, that may harm macromolecules, which trigger the production of oxidative stress molecules and may become toxic because they irrupt into different routes of cell signaling, like cell differentiation, growth and death, and even mutate, all of which may result in the development of cancer cells.

In this regard, there is mounting evidence of the relationship between exposure to environmental pollution and acute myeloid leukemia in children, mainly from benzene exposure [54, 55]. It has been shown that exposure to this compound induces a series of responses related to the cancer process [56], which may be strengthened by simultaneous exposure to other VOCs, as suggested by Belmont et al. [45], who showed a synergistic effect on oxidative stress induction from exposure to toluene, chloroform and dichloromethane. Cancer is just one of several effects that VOCs may have on health: it has been proven that they also affect smell perception, which seriously affects well-being, and that they produce behavioral changes by affecting the central nervous system [2].

Oxidative stress produced from exposure to BTEX may be one of the main mechanisms causing diseases like the loss of pulmonary function [41], skin problems [46, 57] and immunological system disorders [58]. This occurs through the methylation of key genes, like CYP2E1 [59], or the activation of signaling routes that foster inflammation, like PI3K and SAPK, and genetic regulation given by Nrf2 and AhR transcription factors, which foster the transcription of genes involved in the response to xenobiotics and oxidative stress itself, including GST, NQO1, CYP2A1, CYP2E1, HMOX1, HSP70. This could mean that people with prolonged exposure to low levels of BTEX will show chronic inflammation [60], primarily in the respiratory system, which is the main route of entry into the body.

Chronic exposure may affect other sensitive body tissues, like the bone marrow, as evidenced in the IARC monograph 109 [61], where carcinogenicity by outdoor air pollution was declared. This causes leukemia and central nervous system cancer in children exposed to benzene via automobile exhaust smoke or as a result of living in petrochemical areas or because their parents were exposed to gasoline or PM<sub>2.5</sub>. Mother exposure during pregnancy has escaped epidemiological studies establishing a relationship with childhood leukemia, and it would be advisable to consider this aspect, because it has been determined that childhood leukemia appearing in the early years of life may have originated during embryo development [62].

Problems with the study of BTEX lie in the fact that they are not the only pollutants in the atmosphere; thus, it is complex to attribute the effects found in an epidemiological study entirely to them. Exposure to industrial pollution, for example, usually includes exposure to metals as well.

Nevertheless, studies presented in this review show the global reach of VOC pollution, and it is hard for an individual not to be exposed to these compounds, even during embryo development. This type of exposure could also affect the fetal endocrine system, as suggested by

Bolden et al. [10], thus altering not only the developing individual, but also the individual's potential descendants. Therefore, the present environmental pollution situation already becomes a three-generation issue.

In a recent report by the Lancet Commission on Pollution and Health [63], deaths resulting from modern environmental pollution (due to toxics in the air and the occupational environment, as well as soil contamination) were estimated between five and six million worldwide in 2015. A significant aspect is that diseases caused by pollution are of a chronic-degenerative type, not communicable, in 71% of the cases. Major diseases found in children include diabetes, asthma, loss of cognitive function, attention deficit disorder or hyperactivity and autism.

Both the type of pollution and its sources vary as a country develops and industrializes, involving both a health and social cost that is reflected in economic losses of millions of dollars, equal to between 1.7% and 7% of a country's annual healthcare spending, being higher in low and middle-income countries. It was calculated that welfare losses due to pollution amount to 4.6 trillion US dollars per year. These data emphasize the importance of implementing adequate and modern methods to register chronic diseases, particularly those occurring in polluted sites, to find the relationship between pollution and several illnesses that suddenly become frequent.

Such is the case of atopies – which have been highly recurrent in the last few years, especially in populations living in large cities or close to industrial complexes – and endocrine disruptive effects that alter the action of hormones. These findings are tools to demand better environmental policy regulations in several countries, both in the outdoor as well as the occupational environment, because neglecting the environment in the so-called emerging economies runs parallel to lax or completely absent hygiene measures at workplaces where air pollution could be reaching even higher levels than those reported here.

Under this regime, the predicted epidemic of cancer in developing countries is sadly turning into reality [64], particularly childhood leukemia, showing an increase of 21% in México from 2000 to 2004 compared to the levels from 1980 to 1984. México had the highest rate among Latin-American countries, with 5.76 per 100,000 deaths caused by leukemia among children aged 0 to 14 years [65].

### Final remarks

One action critical to keeping emissions into the environment below limits set by organizations like the EPA or ACGIH is implementing permanent environmental monitoring programs, much like in large cities, in populations near highly polluted sites: dumpsites, polluted rivers, industrial and petrochemical areas. A record should be made of every case of associated diseases like those described herein to implement effective health monitoring, which will allow for caring for and supporting these populations and their demands for fulfillment of environmental laws and human rights, because they have the right to breathe clean air, drink clean water and live in a healthy environment. These registers would also contribute to a better understanding of pollution health effects.

Developing countries would greatly benefit from the support of the World Health Organization looking at the domestic microenvironment and issuing recommendations related to environmental health. By resolving the microenvironment, the global environment will certainly improve, including global climate change, which is currently the focus of attention for developing countries. Ultimately, they could leave behind the environmental problems posed by proliferating industrial sites and the health and social issues they inevitably carry.

The experience of developed countries should be shared with developing countries so they can avoid the catastrophic consequences of industrialization and urbanization taking place supposedly to benefit their economies. As established by the Lancet Commission, "The claim that pollution control stifles economic growth and that poor countries must pass through a phase of pollution and disease on the road to prosperity has repeatedly been proven to be untrue" [63].

### Competing Interests

The authors have no competing interests to declare.

### References

- Ait-Helal WA, Borbon S, Sauvage JA**, et al. Volatile and intermediate volatility organic compounds in suburban Paris: Variability, origin and importance for SOA formation. *Atmos. Chem. Phys.* 2014; 14: 10439–64. DOI: <https://doi.org/10.5194/acp-14-10439-2014>
- World Health Organization**. Indoor air quality: organic pollutants. Report on a WHO Meeting, Berlin, 23–27 August 1987. *EURO Reports and Studies*. 1989; 111. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe.
- United States Environmental Protection Agency**. Volatile Organic Compounds (VOCs). *Technical Overview*; 2011. <http://www.epa.gov/iaq/voc2.html#2>.
- International Agency for Research on Cancer**. List of agents classified by the IARC monographs. International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon, France, 1–105. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>. Accessed October 2017.
- Bromberg PA**. Mechanisms of the acute effects of inhaled ozone in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1860: 2771–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.015>
- Global Atmosphere Watch – World Meteorological Organization**. WMO Reactive Gases Bulletin. Highlights from the Global Atmosphere Watch Programme. [https://library.wmo.int/opac/doc\\_num.php?explnum\\_id=3554](https://library.wmo.int/opac/doc_num.php?explnum_id=3554). Accessed October 2017.
- Barreto G, Madureira D, Capani F, Aon-Bertolino L, Saraceno E and Alvarez-Giraldez LD**. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: An oxidative DNA damage pathway. *Environ Mol Mutagen*. 2009; 50: 771–80. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.20500>
- Lee SC, Chiu MY, Ho KF, Zou SC and Wang X**. Volatile organic compounds (VOCs) in urban atmosphere of Hong Kong. *Chemosphere*. 2002; 48: 375–82. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00040-1)
- United States Environmental Protection Agency**. Air Emissions Inventories. [https://www3.epa.gov/cgi-bin/broker?polchoice=VOC&\\_debug=0&\\_service=data&\\_program=dataprog.national\\_1.sas](https://www3.epa.gov/cgi-bin/broker?polchoice=VOC&_debug=0&_service=data&_program=dataprog.national_1.sas). Accessed July 2017.
- Bolden AL, Kwiatkowski CF and Colborn T**. New look at BTEX: Are ambient levels a problem? *Environ Sci Technol*. 2015; 49(9): 5261–76. DOI: <https://doi.org/10.1021/es505316f>
- Evuti AMA**. Synopsis on Biogenic and Anthropogenic Volatile Organic Compounds Emissions: Hazards and Control. *Int J Eng Sci*. 2013; 2: 145–53.
- United States Environmental Protection Agency**. National emissions inventory, version 1 technical support document. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-12/documents/nei2014v1\\_tsd.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-12/documents/nei2014v1_tsd.pdf). Accessed July 2017.
- United States Environmental Protection Agency**. Air Emissions Inventories. [https://www3.epa.gov/cgi-bin/broker?\\_service=data&\\_program=dataprog.national\\_2.sas&\\_debug=0&sector=Industrial%20Processes&pol=VOC&polchoice=VOC](https://www3.epa.gov/cgi-bin/broker?_service=data&_program=dataprog.national_2.sas&_debug=0&sector=Industrial%20Processes&pol=VOC&polchoice=VOC). Accessed July 2017.
- INECC, México D.F.** Evaluación de Compuestos Orgánicos Volátiles para definir medidas de control en la Zona Metropolitana del Valle de México; September 2015. [http://www.inecc.gob.mx/descargas/eventos/2015\\_ehime\\_cca\\_unam\\_cov\\_df\\_mmagana.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/eventos/2015_ehime_cca_unam_cov_df_mmagana.pdf). Accessed October 2017.
- INECC, Monterrey N.L.** Evaluación de Compuestos Orgánicos Volátiles en el Area Metropolitana de Monterrey; September 2015. [http://aire.nl.gob.mx/rep\\_seminario.html](http://aire.nl.gob.mx/rep_seminario.html). Accessed October 2017.
- INECC, CIATEJ**. Evaluación de PM2.5, compuestos orgánicos volátiles y ozono para definir medidas de control en la zona metropolitana de Guadalajara: Etapa III; 2014. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/191426/2014\\_Evaluaci\\_n\\_de\\_PM2.5.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/191426/2014_Evaluaci_n_de_PM2.5.pdf). Accessed October 2017.
- CDMX**. Calidad del aire en la Ciudad de México. *Informe Anual*; 2015. [http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/informe\\_anual\\_calidad\\_aire\\_2015v3/files/downloads/Informe2015v3.pdf](http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/informe_anual_calidad_aire_2015v3/files/downloads/Informe2015v3.pdf). Accessed October 2017.
- Sistema integral de monitoreo ambiental (SIMA), Nuevo León**. [http://aire.nl.gob.mx/rep\\_mensual.html](http://aire.nl.gob.mx/rep_mensual.html). Accessed October 2017.
- United States Environmental Protection Agency**. Air quality guide for ozone; 2015. <https://airnow.gov/index.cfm?action=pubs.aqiguideozone>. Accessed October 2017.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). *US Dep. of Health and Human Services*; 2004.



21. **Batterman S, Su F-C, Li S, Mukherjee B and Jia C.** Personal Exposure to Mixtures of Volatile Organic Compounds: Modeling and Further Analysis of the RIOPA Data. *Resp Rep Health Eff Inst.* 2014; 181: 3–63.
22. **Sosa RE, Bravo HA, Mugica VA, Sanchez PA, Bueno EL and Krupa S.** Levels and source apportionment of volatile organic compounds in southwestern area of Mexico City. *Environ Pollut.* 2009; 157: 1038–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.051>
23. **Gresner P, Stepnik M, Krol MB,** et al. Dysregulation of markers of oxidative stress and DNA damage among nail technicians despite low exposure to volatile organic compounds. *Scand J Work Environ Health.* 2015; 41: 579–593. DOI: <https://doi.org/10.5271/sjweh.3523>
24. **Serrano-Trespacios P, Ryan L and Spengler JD.** Ambient, indoor and personal exposure relationships of volatile organic compounds in Mexico City Metropolitan Area. *J Exposure Anal Environ Epidemiol.* 2004; 14: S118–S132. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500366>
25. **United States Environmental Protection Agency.** Integrated Risk Information System on Benzene. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, D.C.; 2012. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/benzene.pdf>. Accessed June 2017.
26. **Yu M-H, Tsunoda H and Tsunoda M.** *Environmental toxicology, biological and health effects of pollutants.* 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2011.
27. **Riechelmann H.** Cellular and molecular mechanisms in environmental and occupational inhalation toxicology. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 3: Doc02. Published online 2004 Dec 28.
28. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPHs); 1999. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
29. **Bolton JL, Trush MA, Penning MT, Dryhurst G and Monks TJ.** Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13: 135–60. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx9902082>
30. **Costa C, Ozcagli E, Gangemi S,** et al. Molecular biomarkers of oxidative stress and role of dietary factors in gasoline station attendants. *Food Chem Toxicol.* 2016; 90: 30–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.017>
31. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** Toxicological profile for benzene; 1997. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
32. **Ganousis LG, Goon D, Zygiewska T, Wu KK and Ross D.** Cell-specific metabolism in mouse bone marrow stroma: Studies of activation and detoxification of benzene metabolites. *Mol Pharmacol.* 1992; 42: 1118–25.
33. **Johnson ES, Langard S and Lin Y-S.** A critique of benzene exposure in the general population. *Sci Total Environ.* 2007; 374: 183–98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.045>
34. **American Conference of Governmental Industrial Hygienists.** TLVs & BEIs based on the documentation of the Threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological exposure indices; 2011. Cincinnati, Ohio, USA.
35. **Tuakuila J, Kabamba M, Mata H and Mbuyi F.** Tentative reference values for environmental pollutants in blood or urine from the children of Kinshasa. *Chemosphere.* 2015; 139: 326–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.039>
36. **American Conference of Governmental Industrial Hygienists.** Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices; 2015. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
37. **Fang MZ, Shin MK, Park KW, Kim YS, Lee JW and Cho MH.** Analysis of urinary 5-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid as exposure biomarkers of benzene in petrochemical and industrial areas of Korea. *Scand J Work Environ Health.* 2000; 26: 62–6. DOI: <https://doi.org/10.5271/sjweh.511>
38. **González-Jasso E, López T, Lucas D,** et al. CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicol Lett.* 2003; 144: 55–67. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00337-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00337-5)
39. **Yoon HI, Hong YC, Cho SH,** et al. Exposure to volatile organic compounds and loss of pulmonary function in the elderly. *Eur Respir J.* 2010; 36: 1270–76. DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00153509>
40. **Martins PC, Valente J, Papoila AL,** et al. Airways changes related to air pollution exposure in wheezing children. *Eur Respir J.* 2012; 39: 246–53. DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00025111>
41. **Wallner P, Kundi M, Moshhammer H,** et al. Indoor air in schools and lung function of Austrian school children. *J Environ Monit.* 2012; 14: 1976–82. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2em30059a>
42. **Wichmann FA, Müller A, Busi LE,** et al. Increased asthma and respiratory symptoms in children exposed to petrochemical pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123: 632–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.09.052>
43. **de Moraes ACL, Ignotti E, Netto PA, Jacobson LS, Castro H and de Souza Hacon S.** Wheezing in children and adolescents living next to a petrochemical plant in Rio Grande do Norte, Brazil. *J Pediatr (Rio J).* 2010; 86: 337–44. DOI: <https://doi.org/10.2223/JPED.2020>
44. **Cipolla M, Bruzzone M, Stagnaro E,** et al. Health Issues of Primary School Students Residing in Proximity of an Oil Terminal with Environmental

- Exposure to Volatile Organic Compounds. *BioMed Research Int*; 2016.
45. **Belmont-Díaz J, López-Gordillo AP, Molina Garduño E**, et al. 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. *Biomed Res Int*. 2014; 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/425070>
  46. **Rolle-Kampczyk UE, Rehwagen M, Diez U, Richter M, Herbarth O and Borte M**. Passive smoking, excretion of metabolites, and health effects: Results of the Leipzig's Allergy Risk Study (LARS). *Arch. Environ. Health*. 2002; 57: 326–31. DOI: <https://doi.org/10.1080/00039890209601416>
  47. **Rumchev K, Spickett J, Bulsara M, Phillips M and Stick S**. Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax*. 2004; 59: 746–51. DOI: <https://doi.org/10.1136/thx.2003.013680>
  48. **Choi DW, Moon KW, Byeon SHII**, et al. Indoor volatile organic compounds in Environmental Science & Technology Catopy patients' houses in South Korea. *Indoor Built Environ*. 2009; 18: 144–54. DOI: <https://doi.org/10.1177/1420326X08101945>
  49. **Olmos V, Lenzken SC, López CM and Villaamil EC**. High-performance liquid chromatography method for urinary trans,trans-muconic acid. Application to environmental exposure to benzene. *J Anal Toxicol*. 2006; 30: 258–61. DOI: <https://doi.org/10.1093/jat/30.4.258>
  50. **Pelallo-Martínez NA, Batres-Esquivel L, Carrizales-Yáñez L and Díaz-Barriga F**. Genotoxic and hematological effects in children exposed to a chemical mixture in a petrochemical área in México. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2014; 67: 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-014-9999-4>
  51. **Li J, Lu S, Liu G**, et al. Co-exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene and toluene and their dose-effects on oxidative stress damage in kindergarten-aged children in Guangzhou, China. *Sci of the Total Environ*. 2015; 524–25: 74–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.020>
  52. **Flores-Ramírez R, Pérez-Vázquez FJ, Cilia-López VG**, et al. Assessment of exposure to mixture pollutants in Mexican indigenous children. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016; 23: 8577–88. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6101-y>
  53. **Perez-Maldonado IN, Ochoa-Martinez AC, Orta-Garcia ST, Ruiz-Vera T and Varela-Silva JA**. Concentrations of Environmental Chemicals in Urine and Blood Samples of Children from San Luis Potosí, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017; 99: 258–63. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2130-6>
  54. **Houot J, Marquant F and Goujon S**. Residential Proximity to Heavy-Traffic Roads, Benzene Exposure, and Childhood Leukemia-The GEOCAP Study, 2002–2007. *Am J Epidemiol*. 2015; 182: 685–93. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kwv111>
  55. **Vinceti M, Rothman KJ, Crespi CM**, et al. Leukemia risk in children exposed to benzene and PM10 from vehicular traffic: a case-control study in an Italian population. *Eur J Epidemiol*. 2012; 27: 781–90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10654-012-9727-1>
  56. **Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF**, et al. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 2016; 124: 713–21.
  57. **Saijo Y, Kishi R, Sata F**, et al. Symptoms in relation to chemicals and dampness in newly built dwellings. *Int. Arch. Occup Environ Health*. 2004; 77: 461–70. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00420-004-0535-0>
  58. **Dutta A, Roychoudhury S, Chowdhury S and Ray MR**. Changes in sputum cytology, airway inflammation and oxidative stress due to chronic inhalation of biomass smoke during cooking in premenopausal rural Indian women. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2013; 216: 301–08. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.05.005>
  59. **Jiménez-Garza O, Baccarelli AA, Byun H-M, Márquez-Gamiño S, Barron-Vivanco BS and Albores A**. CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit. *Tox Applied Phar*. 2015; 286: 207–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.04.016>
  60. **Thompson PA, Khatami M, Baglolle CJ**, et al. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogen*. 2015; 36(supl 1): S232–S253. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv038>
  61. **International Agency for Research on Cancer**. *Outdoor air pollution. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 2016; 109. IARC-WHO, Lyon, France. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol109/index.php>. Accessed October 2017.
  62. **Belson M, Kingsley B and Holmes A**. Risk factors for acute leukemia in children: A review. *Environ Health Perspect*. 2007; 15: 138–45.
  63. **Lancet**. The Lancet Commission on pollution and health (47 authors); 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
  64. **Vineis P and Xun W**. The emerging epidemic of environmental cancers in developing countries. *Ann Oncol*. 2009 Feb; 20(2): 205–12. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn596>
  65. **Curado MP, Pontes T, Guerra-Yi ME and Cancela MC**. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2011; 29: 96–102. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011000200004>
  66. **Arif AA and Shah SM**. Association between personal exposure to volatile organic compounds and asthma among US adult population. *Int Arch Occup Environ Health*. 2007; 80: 711–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00420-007-0183-2>
  67. **Aynul Bari M, Kindzierski WB and Spink D**. Twelve-year trends in ambient concentrations of volatile organic compounds in a community of

- the Alberta Oil Sands Region, Canada. *Environ Int.* 2016; 91: 40–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.015>
68. **Axelsson G, Barregard L, Holmberg E and Sallsten G.** Cancer incidence in a petrochemical industry area in Sweden. *Sci of the Total Environ.* 2010; 408: 4482–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.06.028>
  69. **Massolo L, Rehwagen M, Porta A, Ronco A, Herbarth O and Mueller A.** Indoor-outdoor distribution and risk assessment of volatile organic compounds in the atmosphere of industrial and urban areas. *Environ Toxicol.* 2010; 25: 339–49. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.20504>
  70. **Godoi RH, Godoi AF, Gonçalves SJ, Jr., et al.** Healthy environment--indoor air quality of Brazilian elementary schools nearby petrochemical industry. *Sci Total Environ.* 2013; 463–464: 639–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.043>
  71. **United States Environmental Protection Agency Integrated Risk Information System.** Advanced Search. [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?first\\_letter=B](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?first_letter=B). Accessed October 2017.
  72. **Ferrero A, Esplugues A, Estarlich M, et al.** Infants' indoor and outdoor residential exposure to benzene and respiratory health in a Spanish cohort. *Environ Pollut.* 2017; 222: 486–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.065>
  73. **Comisión Nacional del Agua (CONAGUA).** Evaluación del Riesgo Sanitario Ambiental de las Zonas Aledañas al Río Atoyac. (Executive summary); July 2008.
  74. **López-Vargas R, Méndez-Serrano A, Albores-Medina A, Oropeza-Hernández F, Hernández-Cadena L, Mercado-Calderón F, Alvarado-Toledo E, Herrera-Morales S, Arellano-Aguilar O, García-Vargas G and Montero-Montoya R.** Oxidative stress index is increased in children exposed to industrial discharges and is inversely correlated with metabolite excretion of Voc. *Environ Mol Mutagen.* DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22207>

**How to cite this article:** Montero-Montoya R, López-Vargas R and Arellano-Aguilar O. Volatile Organic Compounds in Air: Sources, Distribution, Exposure and Associated Illnesses in Children. *Annals of Global Health.* 2018; 84(2), pp. 225–238. DOI: <https://doi.org/10.29024/aogh.910>

**Published:** 27 July 2018

**Copyright:** © 2018 The Author(s). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. See <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



*Annals of Global Health* is a peer-reviewed open access journal published by Levy Library Press.

**OPEN ACCESS**

- Anexo II

FOLIO

Aplicar esta encuesta a **los Padres** de niños que podrían participar en el estudio. Niños en edad escolar: 8 a 13 años, sin enfermedad crónica diagnosticada.

## ENCUESTA PARA ESTABLECER PROBABLES EXPOSICIONES CRONICAS A SUSTANCIAS TOXICAS EN COMUNIDADES DE TLAXCALA

- El propósito de la presente encuesta es conocer cuáles son los riesgos en salud asociados a la contaminación del Río Atoyac. Este estudio depende de la veracidad con que se registren los datos, agradecemos su tiempo y su esfuerzo.

SECCIÓN I. DATOS GENERALES							
Nombre: _____							
Teléfono _____							
Dirección _____							
<b>1. ¿Qué edad tiene?</b> <input style="width: 50px; height: 20px;" type="text"/>	<b>2. Sexo</b> ① Masculino  ② Femenino	<b>3.- ¿Cuántos integrantes (madre, padre, hijos) conforman su núcleo familiar y qué edad tienen?</b>					
		<b>Integrante</b>	<b>Edad</b>	<b>Fecha de nacimiento</b>	<b>Integrante</b>	<b>Edad</b>	<b>Fecha de nacimiento</b>
		1			4		
		2			5		
		3			6		
<b>4.- Nivel de estudio padres:</b>							
<b>Nivel de estudio</b>	<b>Madre</b>			<b>Padre</b>			
Primaria	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
Secundaria	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
Preparatoria	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
Nivel Técnico	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
Escuela Normal	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
Licenciatura o ingeniería	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
Posgrado	Incompleta① terminada②			Incompleta① terminada②			
<b>5. Nombres de los hijos que podrían participar en el estudio, de 8 a 13 años, sin enfermedad crónica diagnosticada.</b>							
<b>Hijo 1</b>							
<b>Hijo 2</b>							
<b>Hijo 3</b>							



**SECCIÓN II. DATOS SOBRE LOCALIDAD EN DONDE VIVE**

<p><b>6. ¿Cuánto tiempo lleva viviendo en la localidad?</b></p> <p>_____ años</p>	<p><b>8. ¿Percibe olores molestos a causa del rio?</b></p> <p>① Si                    ② No (pasar a 11)</p> <p><b>9. ¿Cómo es el olor?</b></p> <p>① Apestoso            ② Irritante</p> <p>③ Insoportable      ④ Otro especifique _____</p> <p><b>10. ¿El olor le causa alguna molestia?</b></p> <p>① Dolor de cabeza            ⑤ Lagrimeo</p> <p>② molestias en la garganta    ⑥ Irritacion en la piel</p> <p>③ Somnolencia                    ⑦ Náuseas</p> <p>④ Cambios de humor            ⑧ Otro _____</p>	<p><b>11. ¿Cerca de su casa pasa algún canal de aguas negras o drenaje de la comunidad que no esté entubado?</b></p> <p>① Si                    ② No, tengo drenaje entubado</p> <p><b>12. ¿Salen olores molestos de los canales o drenaje de su casa?</b></p> <p>① Si                    ② No (Pase a la 15)</p> <p><b>13. ¿Cómo es el olor?</b></p> <p>① Apestoso            ③ Insoportable</p> <p>② Irritante            ④ Otro especifique _____</p>
<p><b>7. ¿A qué distancia vive del rio Atoyac?</b></p> <p>_____ metros</p>		

<p><b>14. ¿El olor le causa alguna molestia?</b></p> <p>① Dolor de cabeza            ② molestias en la garganta            ③ Somnolencia            ④ Cambios de humor</p> <p>⑤ Lagrimeo                    ⑥ Irritacion en la piel            ⑦ Náuseas            ⑧ Otro _____</p>		
<p><b>15. ¿Cuántas horas pasa en su casa en promedio?</b></p> <p>_____ hrs/día</p>	<p><b>16. ¿Con que frecuencia sale de la localidad durante la semana o durante el mes?</b></p> <p>_____ días</p>	<p><b>17. ¿Por cuánto tiempo sale al día?</b></p> <p>_____ hrs/día</p>

**SECCIÓN III. DATOS SOBRE EL USO DEL AGUA**

<p><b>18. ¿Cómo obtiene el agua para su casa?</b></p> <p>① Pozo privado</p> <p>② Toma de agua pública</p> <p>③ Pozo público</p> <p>④ Otro _____</p>	<p><b>19. ¿El agua tiene algo en especial?</b></p> <p>① Olor raro            ③ Sabor raro</p> <p>② Color raro            ④ Otro ⑤ Nada</p> <p><b>20.- Especifique que tiene el agua:</b></p> <p>_____</p>	<p><b>21. ¿Usa agua de garrafón para preparar sus alimentos?</b></p> <p>① Si                    ② No (Pase a la 23)</p> <p><b>22. En caso positivo ¿Desde cuándo?</b></p> <p>_____</p>
---	---	--

**SECCIÓN IV. SECCIÓN DIETA FAMILIAR**

**23. Durante una semana típica ¿Qué comidas realizan usted y su familia?**

	<b>Desayuno</b>	<b>Comida</b>	<b>Cena</b>	<b>Otras</b>
<b>1. Integrante 1</b>	①	②	③	④
<b>2. Integrante 2</b>	①	②	③	④
<b>3. Integrante 3</b>	①	②	③	④
<b>4. Integrante 4</b>	①	②	③	④

**24. ¿Con qué frecuencia consume su familia los siguientes alimentos?**

	<b>Nunca-menos de 5 veces al año</b>	<b>1-4 x sem</b>	<b>1x día</b>
<b>Alimentos fritos</b>	①	②	③
<b>Alimentos cocidos</b>	①	②	③
<b>Alimentos hervidos</b>	①	②	③
<b>Alimentos asados</b>	①	②	③
<b>Alimentos horneados</b>	①	②	③
<b>Alimentos al carbón</b>	①	②	③
<b>Ensaladas de vegetales crudos</b>	①	②	③
<b>Vegetales cocidos</b>	①	②	③
<b>Fruta fresca</b>	①	②	③
<b>Huevo</b>	①	②	③
<b>Carne roja</b>	①	②	③
<b>Pollo</b>	①	②	③
<b>Pescado de mar</b>	①	②	③
<b>Pescado de río</b>	①	②	③
<b>Refrescos o agua azucarada</b>	①	②	③
<b>Agua natural</b>	①	②	③

**SECCIÓN VI A. DATOS OCUPACIONALES DE LOS PADRES DE FAMILIA (TRABAJO EN EL CAMPO)**

**25. ¿Uno o los dos padres trabajan o trabajaron en el campo?**

Madre ① Si ② No (pase a la 40)

Padre ① Si ② No (pase a la 40)

**26. ¿Durante cuánto tiempo ha trabajado en el campo?**

Madre \_\_\_\_ años \_\_\_\_ meses

Padre \_\_\_\_ años \_\_\_\_ meses

**27. ¿Qué cultiva o cultivaba?**

Especifique:

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**28. ¿Usa o usó plaguicidas?**

① Herbicidas ② Rodenticidas

③ Insecticidas ④ Otro

\_\_\_\_\_

**29. ¿A que edad empezó a usarlos?**

Madre \_\_\_\_\_ años

Padre \_\_\_\_\_ años

**30. ¿Cuánto tiempo los ha usado?**

Madre \_\_\_\_ años \_\_\_\_ meses

Padre \_\_\_\_ años \_\_\_\_ meses

**31. ¿Con que frecuencia los usa o usaba?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**32. ¿Cómo los aplica o aplicaba?**

M P

① ① Con bomba manual

② ② Con tanque a la espalda

③ ③ Otro \_\_\_\_\_

**33. ¿Usa o usaba equipo de protección?**

Madre ① Si ② No

Padre ① Si ② No

**34. ¿En que consiste o consistía el equipo de protección?**

M P

M P

① ① Guantes ⑤ ⑤

Cubrebocas

② ② Overol de tela ⑥ ⑥ Pañuelo

③ ③ Botas ⑦ ⑦

Otro \_\_\_\_\_

④ ④ Goggles ⑧ ⑧ Ninguno

**35. ¿Después de trabajar en el campo se cambiaba de ropa para estar en casa?**

Madre ① Si ② No

Padre ① Si ② No

**36. ¿Alguna vez se intoxicó por usar estos compuestos?**

Madre ① Si ② No (pase a la 40)

Padre ① Si ② No (pase a la 40)

**37. En caso positivo por favor explique:**

**¿Cómo se sintió?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**38. ¿Qué hizo para resolver el problema?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**39. ¿Le quedó alguna complicación?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**SECCION VI B. TRABAJO EN INDUSTRIA**

**40. ¿Uno de los padres trabaja o trabajó en la industria?**

Madre ① Si ② No (pase a la 54)

Padre ① Si ② No (pase a la 54)

**41. ¿Durante cuantos años ha trabajado en la industria?**

Madre \_\_\_\_\_ años

Padre \_\_\_\_\_ años

**42. ¿En qué tipo de industria ha trabajado?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**43. ¿En qué área ha trabajado?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**44. ¿En qué ha consistido su trabajo en la industria?**

**Nombre y Descripción.**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**45. ¿A que edad inició en este empleo?**

Madre \_\_\_\_\_ años

Padre \_\_\_\_\_ años

**46. ¿A que edad dejó este empleo?**

Madre \_\_\_\_\_ años

Padre \_\_\_\_\_ años

**47. ¿Usó o usaba equipo de protección para realizar su trabajo?**

Madre ① Si ② No

Padre ① Si ② No

**48. ¿Su equipo de protección en que consistía?**

**M P**

**M P**

① ① Guantes ⑤ ⑤ Goggles

② ② Overol de tela ⑥ ⑥

Cubrebocas

③ ③ botas ⑦ ⑦

Mascarilla

④ ④ casco ⑧ ⑧ Traje

especial

⑨ ⑨ Otro \_\_\_\_\_

**49. ¿Con que frecuencia usaba este equipo en una semana típica de trabajo?**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

**50. ¿Alguna vez se intoxicó en su trabajo?**

Madre ① Si ② No (pase a la 54)

Padre ① Si ② No (pase a la 54)

**51. ¿Tuvo que ser hospitalizado a causa de la intoxicación?**

Madre ① Si ② No

Padre ① Si ② No

**52. ¿Tuvo alguna complicación por la intoxicación?**

Madre ① Si ② No

Padre ① Si ② No

**53. Especifique su complicación**

Madre \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

¿A qué se dedican actualmente (padre-madre)? \_\_\_\_\_

**SECCION V. ANTECEDENTES CLINICOS**

<b>54. ¿Alguno de los padres trabaja o ha trabajado en alguna de las siguientes áreas?</b>			<b>55. ¿Alguno de sus hijos padece o padeció?</b>			
	<b>PADRE</b>	<b>MADRE</b>		<b>HIJO 1</b>	<b>HIJO 2</b>	<b>HIJO 3</b>
① Gasolinera	①	②	① Asma	①	②	③
② Taller mecánico	①	②	② alergias digestivas	①	②	③
③ Tienda de plaguicidas	①	②	③ Alergias en la piel	①	②	③
④ Tlapalería	①	②	④ Infecc Frecuentes	①	②	③
⑤ Tornero	①	②	⑤ Anemia	①	②	③
⑥ Chofer	①	②	⑥ Leucemia	①	②	③
⑦ Quemando basura	①	②	⑦ Purpura Trombocitopenica	①	②	③
⑧ Costura	①	②	⑧ Problemas renales	①	②	③
⑨ Plomería	①	②	⑨ Problemas hepáticos	①	②	③
⑩ Alfarería	①	②	<b>56.- ¿Algúno de sus hijos presenta o presentó algunos de estos síntomas?</b>			
			<b>HIJO 1    HIJO 2    HIJO 3</b>			
⑪ Transportista de material peligroso	①	②	① Puntos rojos en la piel	①	②	③
⑫ Soldador	①	②	② Moretones en la piel sin razon	①	②	③
⑬ Bombero	①	②	③ Sangrado nasal o de encías	①	②	③
⑭ Recolector de Río	①	②	④ Fiebre de más de 2 semanas	①	②	③
⑮ Lavandería de mezclilla	①	②	⑤ Pérdida de peso sin motivo	①	②	③

Otro trabajo _____	⑥ Ganglios inflamados      ①                      ②                      ③
<b>57. ¿Alguno de sus hijos nació con alguna malformación, usted tuvo algún aborto o problema durante el embarazo o parto?</b>  ① Si  ② No <b>Describa</b> _____	<b>58. ¿Alguno de sus hijos tiene o tuvo problemas para...?</b>  ① Aprender a caminar      ③ Aprender en la escuela  ② Aprender a hablar      ④ Ninguno

**SECCIÓN VI. ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES CRÓNICAS EN LA FAMILIA**

59. ¿Algunos de los padres, o abuelos padecieron o padecen alguna de las siguientes enfermedades?	Abuelos Paternos	Abuelos Maternos	Padre	Madre
① Diabetes	①	②	③	④
② Presión Alta	①	②	③	④
③ Cáncer	①	②	③	④
④ Enf. del corazón	①	②	③	④
⑤ Insuf Renal	①	②	③	④
⑥ Insuf Hepática	①	②	③	④
⑦ Asma	①	②	③	④
⑧ Alergias	①	②	③	④
⑨ Alguna malformación	①	②	③	④
⑩ Otros				

**SECCION VII. CONDICIONES AMBIENTALES DE LA FAMILIA**

<p><b>60. ¿La madre aspiraba humo de cigarro cuando estaba embarazada?</b></p> <p>① Si                      ② No (Pase a la 62)</p> <p><b>61. ¿Con que frecuencia ocurrió eso durante sus embarazos?</b></p> <p>① Siempre              ② Frecuentemente</p> <p>③ Algunas veces      ④ Rara Vez</p> <p>⑤ Nunca</p> <p><b>62. ¿Hay o había un fumador en el hogar durante la infancia de los niños?</b></p> <p>① Si                      ② No (Pase a la 64)</p> <p><b>63. ¿Esa persona fuma o fumaba dentro de la casa?</b></p> <p>① Si                      ② No</p> <p><b>64. ¿La o las escuelas de sus hijos estan (estaban) cercanas al rio Atoyac o canal?</b></p> <p>① Si                      ② No</p> <p><b>65. Nombre de la escuela</b></p> <p>_____</p>	<p><b>66. ¿Llegan o llegaban olores del río o de las industrias a la escuela de sus hijos en horario de clases?</b></p> <p>① Si                      ② No (Pase la 69)</p> <p><b>67. ¿Especifique el tipo de olor?</b></p> <p>① Apestoso ③ Insoportable</p> <p>② Irritante ④ Otro _____</p> <p><b>68. ¿El olor le causa alguna molestia?</b></p> <p>① Dolor de cabeza</p> <p>② Molestias en la garganta</p> <p>③ Somnolencia</p> <p>④ Cambios de humor</p> <p>⑤ Lagrimeo</p> <p>⑥ Irritacion en la piel</p> <p>⑦ Todas las anteriores</p> <p><b>69. ¿Hay algún tiradero de basura cerca de la escuela de sus hijos?</b></p> <p>① Si                      ② No</p> <p><b>70. ¿Queman basura en horas de clase y llega el humo a la escuela de sus hijos?</b></p> <p>① Si                      ② No (Pase a la 72)</p>	<p><b>71. ¿Con que frecuencia ocurre esto?</b></p> <p>_____</p> <p><b>72. ¿Alguno de sus hijos fuma?</b></p> <p>① Si                      ② No (Pase a la 75)</p> <p><b>73. ¿Desde qué edad?</b></p> <p>_____ años</p> <p><b>74. ¿Qué edad tiene actualmente?</b></p> <p>_____ años</p> <p><b>75. ¿Alguno de sus hijos bebe alcohol?</b></p> <p>① Si                      ② No (Pase a la 78)</p> <p><b>76. ¿Desde qué edad?</b></p> <p>_____ años</p> <p><b>77. ¿Qué edad tiene actualmente?</b></p> <p>_____ años</p> <p><b>78. ¿Algunos de sus hijos trabaja o trabajó?</b></p> <p>① Si                      ② No</p>
<p><b>79. ¿ Desde qué edad?</b> _____ años      <b>80. ¿En qué consiste o consistió su trabajo?</b> _____</p>		

Nombre del encuestador \_\_\_\_\_

Notas:

- **Anexo III**

**Distancia en metros de la vivienda con el Río Atoyac o canales adyacentes** en la población de Tepetitla de Lardizábal y porcentaje de encuestados que viven a esas distancias.

Distancia al río en metros	Viviendas que se ubican a menos de esa distancia (%)
Menos de 100	10.5
100-499	56.7
500-1000	25.8
1001-2000	7



- **Anexo IV**

**Oxidative Stress Index is increased in children exposed to industrial discharges and is inversely correlated with metabolite excretion of VOC**

## Research Article

### Oxidative Stress Index Is Increased in Children Exposed to Industrial Discharges and Is Inversely Correlated with Metabolite Excretion of Voc

Rocío López-Vargas,<sup>1</sup> Alejandra Méndez-Serrano,<sup>2</sup>  
Arnulfo Albores-Medina,<sup>3</sup> Fernando Oropeza-Hernández,<sup>4</sup>  
Leticia Hernández-Cadena,<sup>5</sup> Franciso Mercado-Calderón,<sup>6</sup>  
Esmeralda Alvarado-Toledo,<sup>4</sup> Selene Herrera-Morales,<sup>1</sup>  
Omar Arellano-Aguilar,<sup>7</sup> Guadalupe García-Vargas,<sup>2</sup> and  
Regina Montero-Montoya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, CDMX, Mexico

<sup>2</sup>Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Comunitario, A. C

<sup>3</sup>Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CDMX, Mexico

<sup>4</sup>Laboratorio de Toxicología Industrial, Hospital General de Nanchital, Petróleos Mexicanos, Mexico

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Salud Pública, Ciudad de México, Mexico

<sup>6</sup>Coordinación de Salud en el Trabajo, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>7</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Although the Atoyac River has been classified as highly polluted by environmental authorities, several communities are settled on its banks, affecting around 1.5 million persons, as well as farmland, due to an environmental distribution of toxics in the area. Our aim was to demonstrate that this environment affects important physiological processes that have an impact in health, so we conducted a study of schoolchildren from small communities on the banks of the river and in another similar town located far from it. 91 and 93 students, boys and girls, were studied from each site for oxidative stress index (OSI), calculated from the total antioxidant capacity and the total oxidative status, BTEX metabolite excretion and relevant

metabolic polymorphisms participating in the bioactivation-detoxification of most VOC: CYP2E1 RsaI, NQO1 C609T, and null polymorphisms of GSTT1 and GSTM1. Results showed that OSI was significantly higher in children living by the river ( $5.23 \pm 3.4$  vs  $2.59 \pm 1.46$ , 95% C.I.). At this site, OSI was correlated with diminished metabolite excretion and a diminished antioxidant capacity; an association with genotypes CYP2E1 RsaI (c2c2), GSTT1 present and NQO1 \*2 (CC) was also observed. Furthermore, boys at this site exhibited a diminished BMI compared to boys from the other community who were younger. In conclusion: children living at polluted sites like this, show early biological effects that might lead to health

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Universidad Nacional Autónoma de México.

Grant sponsor: CONACYT provided a fellowship for Rocío López-Vargas, a student of the Ph.D. Program of Biological Science; Grant number: 259598.

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Grant number: Children's Environmental Health Network 251229/271, Fellowship number 259598.

\*Correspondence to: Regina Montero-Montoya, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. C.P. 04510, Ciudad de México. E-mail: dorinda@biomedicas.unam.mx

Received 12 March 2018; provisionally accepted 25 April 2018; and in final form 4 May 2018

DOI 10.1002/em.22207

Published online 3 July 2018 in  
Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

problems in their adult life. Environmental protection should be enforced to protect people's health in these sites where not even

environmental monitoring is done. *Environ. Mol. Mutagen.* 59:639–652, 2018. © 2018 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** oxidative stress index; polluted river; BTEX metabolites; metabolic polymorphisms; exposed children

**INTRODUCTION**

The Atoyac River has been classified as heavily polluted by CONAGUA, a federal agency regulating the use of fresh water in Mexico [2011]. It is located in central Mexico, on the border between the states of Tlaxcala and Puebla, and despite being highly polluted, several communities are settled on its banks, affecting around 1.5 million persons, as well as farmland.

The water of the river has been studied for its content of toxic compounds by different groups, both official and academic [Navarro et al., 2004; IMTA-CONAGUA, 2008; Greenpeace México, 2014; Arellano-Aguilar et al., 2015], all of which have demonstrated its poor quality and that it is neither suitable for human nor agricultural use (Table I). Recent inspections following treatment plant repairs to determine whether the water quality had improved revealed that the river continues to be highly polluted (Supporting Information S1). The river ceased sustaining vertebrate life long ago and currently only microorganisms are present, many of which have

developed multiresistance to antibiotics and metals [Castillo, 2014].

In an earlier study, we demonstrated that inhabitants of five communities on the banks of the river had higher and more complex genotoxic damage compared to inhabitants from more distant communities and from the highly polluted Mexico City area [Montero et al., 2006].

The Atoyac River receives waste from industrial discharges, mainly in liquid form, containing a large amount of volatile organic compounds. Previous studies reported the presence of toluene, chloroform and dichloromethane [Navarro et al., 2004], however, work by IMTA-CONAGUA [2008] revealed a more varied mixture of VOC compounds (Table I). To have an estimation of the levels that some of the reported compounds could reach in the air around the river, passive samplers were used in several locations in the communities of Tepetitla and Ixtenco, Tlaxcala. BTEX (acronym for Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes) and chlorinated compounds (chloroform, dichloroethylene, and dichloromethane) were determined and BTEX were detected, both in Tepetitla

**TABLE I. Toxic Compounds Reported in Atoyac River Water (CONAGUA, 2011; Greenpeace, 2014) and Effects on Organ or System**

Compound	Ca	Nt	ED	Resp	Ren	Cv	Hep	Imm	Hem	Derm	Reference
Benzene	+	+	+	+				+			EPA-IRIS monografía, Bolden et al. [2015]
Vinyl chloride	+	+	+	+			+	+		+	ATSDR
Formaldehyde	+	+		+	+		+	+		+	ATSDR
Pentachlorophenol	+		+				+	+			ATSDR
Trichloroethylene	+	+	+				+	+		+	ATSDR, Chia et al. [1997], Tachachartvanich et al. [2018]
As	+			+	+		+		+	+	ATSDR
Ni	+			+	+			+	+		ATSDR
Cd	+		+	+	+						ATSDR
Cr VI	+		+	+	+				+		ATSDR
Toluene		+	+	+		+		+			ATSDR, Bolden et al. [2015]
Hg		+	+	+	+					+	ATSDR
Pb		+	+		+				+		ATSDR
1,2-dichlorobenzene			+	+							Versonnen et al. [2003]
1,4-dichlorobenzene			+	+			+				Versonnen et al. [2003]
Bis-2(ethylexyl)phthalate			+				+				NIOSH
Phenol				+	+		+			+	ATSDR
Xylenes		+		+	+	+	+	+			ATSDR, Bolden et al. [2015]
Aniline									+	+	ATSDR
Chloroform		+			+					+	ATSDR
Ethylbenzene				+	+	+		+			ATSDR, Bolden et al. [2015]
Cresols		+	+	+	+		+		+	+	ATSDR

Ca:carcinogen; Nt:neurotoxic; ED: endocrine disruptor; Resp:respiratory damage; Ren:renal damage; Cv: cardiovascular damage; Hep: hepatic damage; Imm: immunological damage; Hem: hematological damage; Derm: dermatological damage.

and Ixtenco, with the levels found in Tepetitla being higher than those in Ixtenco by a ratio of 2:1 (Supporting Information S2).

Notwithstanding the foregoing, health authorities attribute little importance to the pollution of this river and have neither established a monitoring program for early biological effects and the registration of illnesses that could be attributed to the presence of the toxic compounds found in this stream, nor are they working with environmental authorities to design a program to control pollutant discharges to protect people in these communities.

In an attempt to demonstrate that this environment affects important physiological processes that have an impact on health, we conducted a study of schoolchildren from two small communities settled on the banks of this river—where the perception is that the river makes them ill—and compared them to children from a town of similar socio-economic level and cultural traditions located at a distance from the river.

The results presented here correspond to the determination of the Oxidative Stress Index measured in blood plasma and how it correlates with the urinary excretion of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes) metabolites and with the metabolic polymorphisms

relevant to the biotransformation of these volatile organic compounds.

## MATERIAL AND METHODS

### Ethical Committee Approval

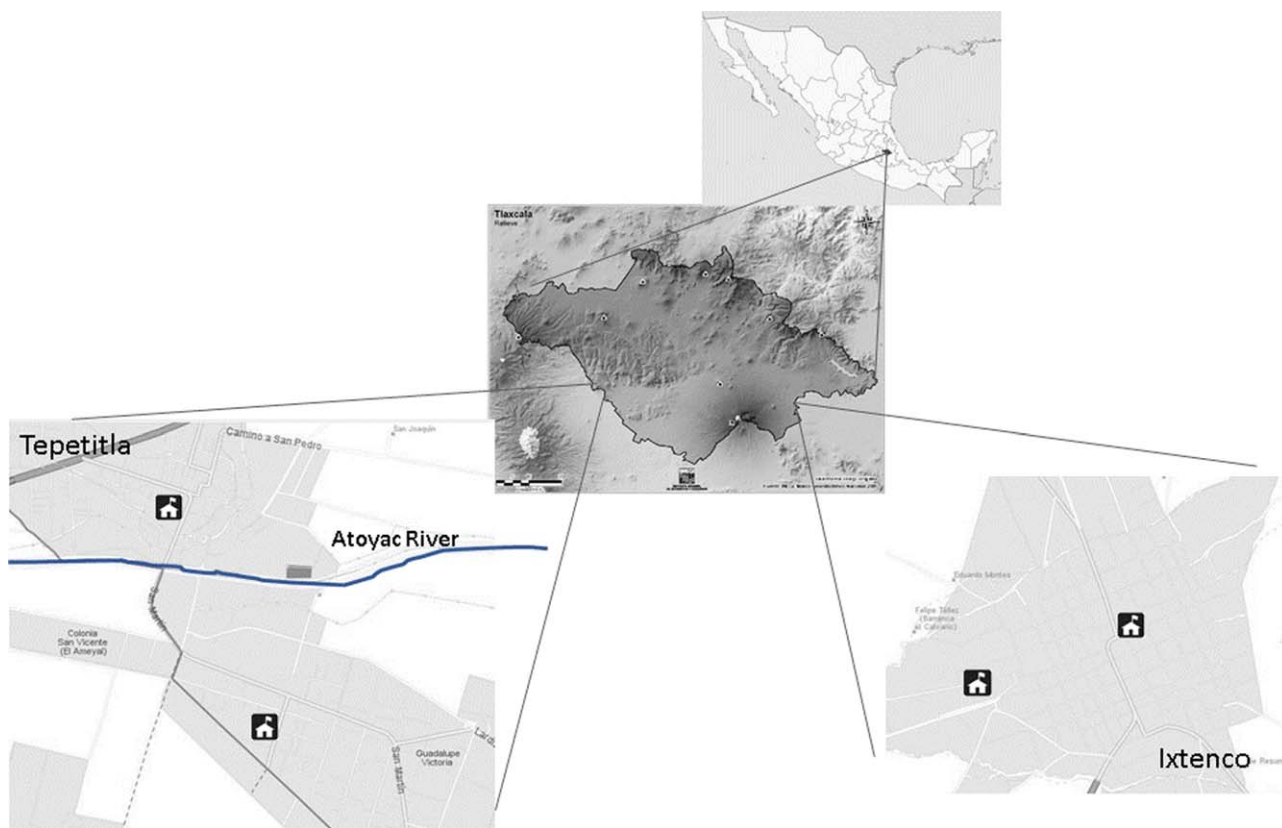
The entire protocol was approved by the Bioethics Committee of the Institute.

### Informed Consent

To obtain the collaboration of the parents, personnel from the NGO Fray Julián Garcés visited the public elementary schools in Villa Alta and San Mateo, in the county of Tepetitla, near the river, as well as schools in Ixtenco, the town taken as reference (Fig. 1). The principals agreed to participate in the study and, with their assistance, the parents were informed of the study. Those allowing their children to be sampled signed a letter of informed consent and answered a questionnaire designed to obtain information regarding their occupation, the environment around their houses and in their community, the use of water at home and family history of noncommunicable diseases such as diabetes, cancer, renal failure, and others.

### Inclusion Criteria

Children aged 8 to 13 years old, regularly attending school, not diagnosed with a chronic illness and nonsmokers were included in the study.



**Fig. 1.** Sites of study in the State of Tlaxcala. Small houses with a flag represent the location of the schools where sampling took place. In Tepetitla, the schools were at 400 m and 760 m from the Atoyac river. Schools in Ixtenco were not near an open water stream.

### Exclusion Criteria

Children with diagnosed chronic diseases or with an acute infection on the day of sampling were not included in the study. Menstruating girls were also excluded from the study.

### Anthropometric Measures and Sampling

The days for sampling collection were announced in advance. The day before sampling, the children were weighed and measured with an InBody 230 Body Composition Analyzer (Biospace, Korea). Cups for urine collection, new and sterile, were given to each participant with the instructions to collect the first urine passed the next morning. The next morning at 7:00 am urine samples were received and placed in an ice chest and a professional nurse drew 3 mL of venous blood from each child in 2 vacutainer tubes. These samples were kept in a cool environment, also in an ice chest, and all samples were immediately transported to a clinical laboratory in Mexico City to perform general urine analysis and hematic biometry. The second blood samples were taken to the laboratory at U.N.A.M. to separate the plasma and keep them frozen ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) to evaluate OSI the following day. The cell pellets were frozen and used to extract DNA for metabolic polymorphism determination.

### TOS (Total Oxidative Status)

Reagents for these determinations were purchased from Sigma México. TOS was determined in plasma using the method described by Ereli [2005], where oxidants present in the sample oxidize the ferrous ion-*o*-dianisidine complex to ferric ion. The ferric ion then makes a colored complex with xylenol orange in an acidic medium, and was spectrophotometrically registered at 560/800 nm. The standard curve was performed with hydrogen peroxide and the results expressed in terms of micromolar hydrogen peroxide equivalent per liter ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv/L).

### TAC (Total Antioxidant Capacity)

The method by [Ereli, 2004] was used, consisting of the generation of the hydroxyl radical by a Fenton reaction of the  $\text{Fe}^{2+}$ -*o*-dianisidine complex with a standardized solution of hydrogen peroxide. The reactive oxygen species (ROS) generated oxidize the colorless *o*-dianisidine molecules to yellow-brown colored dianisidyl radicals at low pH. Further oxidation reactions take place intensifying color formation, unless antioxidants suppress those reactions; these antioxidants are those present in each sample and total antioxidant capacity may be determined by the suppression of color. Reactions were monitored after 3:30 min in a spectrophotometer at 440 nm. Color intensity is inversely related to the amount of antioxidants in the samples. The standard curve was calibrated with Trolox, and the results were expressed as millimolar Trolox equivalents per liter (Trolox mmol eqv/L).

### OSI (Oxidative Stress Index)

This index allows for a rapid assessment of the level of oxidative stress in samples. It is the percent ratio of the total peroxide to the total antioxidant potential based on the formula:  $\text{OSI} = [(\text{TOS H}_2\text{O}_2 \mu\text{mol eqv/L}) / (\text{TAC Trolox } \mu\text{mol eqv/L})] \times 100$ . It is expressed in arbitrary units.

Determinations for both TOS and TAC were made 24 hr after taking the samples, with plasma samples that had been kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### BTEX Metabolites in Urine

Standards for *ortho*-cresol (*o*-C), methyl-hippuric acids (MHA), phenyl-mercapturic acid (PMA), phenyl-glyoxylic acid (PGA), and

mandelic acid (MA) were all purchased from Sigma-Aldrich-Fluka, with 98% purity.

Equipment: The gas chromatograph was a model 789A GC, with a 5975C inert Mass Selective Detector MSD and a model 7693 autosampler, all from Agilent Technologies. The HPLC with a diode array was a 1200 Series model from Agilent Technologies. The HPLC-MS-MS was purchased from Thermo Scientific, models Finnigan Surveyor LC Pump Plus and TSQ QUANTUM Access Max, respectively, with a Finnigan Surveyor autosampler.

Standard curves were prepared for seven metabolites: *o*-C, PMA, MHA (*ortho*-, *meta*-, *para*-), PGA, and MA. They were also used to determine the limit of detection (LoD). To obtain the limit of quantification (LoQ), urine solutions were prepared with known concentrations of the standards and were quantified at the same time as the samples. Table II shows the methods used to quantify each metabolite. Creatinine levels were used to adjust metabolite concentrations, according to ACGIH [2015] recommendations.

### O-Cresol

*O*-cresol is used to monitor exposure to toluene. The NIOSH 8305 [1994] method was used with modifications to prepare the samples. The units are given in mg/L, the concentration of the analyte was calculated after adjustment for creatinine concentration in urine, based on the BEI specified by ACGIH limits of 0.3 mg/g creatinine (Table II).

### Phenyl-Mercapturic Acid

PMA indicates exposure to benzene. The NIOSH 8326 [2014] method was used for the preparation of samples for analysis. Identification was based on the isocratic mode of separation (Table II).

### Methyl-Hippuric Acids (Ortho-, Meta- Para-), Phenyl-Glyoxylic Acid and Mandelic Acid

MHA are the metabolites of xylene mixture, whereas PGA and mandelic acid (MA) are metabolites of ethyl-benzene and styrene. Analytical preparation of urine samples and quantification were performed following NIOSH method 8301 [2003] with modifications based on Ogata and Sugihara [1978], that allow these determinations to be made at the same time. Identification was based on an isocratic mode of separation. The concentration of each analyte was calculated following adjustment for creatinine concentration (Table II).

### DNA Extraction

A DNeasy Kit (QIAGEN group, Hilden, Germany) was used to extract DNA from frozen blood samples. Instructions from the manufacturer were followed, including a proteases treatment.

### Metabolic Polymorphisms

#### CYP2E1 RsaI

Amplification and determination of this polymorphism was conducted following the PCR-RFLP method developed by Hayashi et al. [1991]. The oligonucleotides used are presented in Table III. PCR reactions were performed with a Mastercycler Gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified fragment was digested with 0.1  $\mu\text{L}$  of *RsaI* restriction enzyme for 24 hr at  $37^{\circ}\text{C}$ . The products were run in 3% agarose gels with Midori Green and genotypes were defined according to the number and size of the bands obtained (Table III).

#### Nqo1 C609T

Amplification and determination of this polymorphism was made by PCR-RFLP, based on the method by Eguchi-Ishimae et al. [2005]. Primers

TABLE II. Determination of BTEX Metabolites

Chromatographic method	Column	Metabolite	Compound	Limit of detection	Limit of quantification	BEI (ACGIH)	Retention time	Method
GC-FID	30 m capillary bonded with phenyl-methylsiloxane	o-cresol	Toluene	0.1 mg/L	0.5 mg/L	0.3 mg/g creatinine		NIOSH 8305 with modifications
HPLC-MS	Hypersil gold 50 mm, 4 mm diameter, particle 3 µm	Phenyl-mercapturic acid	Benzene	1 µg/L	25 µg/L	25 µg/g creatinine		NIOSH 8326
HPLC-UV	ODS hypersil c18, 200 mm long, 4.6 mm diam, 5 µm particle	Ortho-, Para-, Meta-, methylhippuric acids	Xylenes	1.2 µg/mL, 2.4 µg/mL	3 µg/mL, 6 µg/mL	1.5 g/g creatinine	6.5 min, 12 min	NIOSH 8301, Ogata et al. [1978]
HPLC-UV <sup>a</sup>	ODS hypersil c18, 200 mm long, 4.6 mm diam, 5 µm particle	Phenyl-glyoxylic acid, Mandelic acid	Ethylbenzene	0.8 µg/mL, 4 µg/mL	2 µg/mL, 10 µg/mL	150 mg/g creatinine	0.8 min, 3.1 min	NIOSH 8301, Ogata et al. [1978]

<sup>a</sup>Xylenes and ethylbenzene exposure were measured at the same time.

used and amplification conditions are shown in Table III, to obtain a 299 bp fragment. Digestion was performed with *HinfI* enzyme and the products of digestion were run in 3% agarose gels to identify the genotypes.

### GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms

Amplification of genotypes *GSTM1* and *GSTT1* was accomplished by simultaneous PCR following Hirvonen et al. [1993] and Pemble et al. [1994]. A sequence of 273 bp was amplified for *GSTM1*, and for *GSTT1*, the fragment amplified was of 480 bp, with the oligonucleotides shown in Table III. After amplification, polymorphisms were determined for the presence or absence of the expected fragment in 2% agarose gels, stained with Midori Green (Table III).

### Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted using the Stata 12 program and GraphPad Prism 6. The Shapiro-Wilk test was used to verify normality. Statistical comparisons for TAC, OSI and metabolite concentrations between the communities studied (Ixtenco and Tepetitla) were made with the Mann-Whitney U-test. A Student's t-test was used for TOS, with normally distributed data. The OSI variable was log-transformed to obtain a normally-distributed  $\ln$ OSI variable which was used to look for correlations with other variables studied.

To analyze the risk due to the exposure to BTEX, a z-score was calculated for the values of each metabolite [Hunter and Hamilton, 2002]. The z-scores obtained for each sample and each metabolite were then added to obtain a general z-score of metabolite concentrations for each individual.

A Lasso parsimonious model was used to determine whether the polymorphisms studied contributed to OSI. Allelic variants associated with a modification of OSI were selected on the basis of the lowest CP regression coefficient given by the Akaike (AIC) value [Tibshirani, 1996; Bind et al., 2014]. The analysis was done with the Lasso module of Stata 12, which provides a  $\beta$  value representing the importance of the variable, being higher according to its influence on OSI increase. Negative  $\beta$  values are related to a decreased OSI value, whereas values of zero indicate the variables do not have an influence on OSI ( $\ln$ OSI was used for this analysis).

Other variables could contribute to OSI values and in a first approach to find them, a bivariate analysis with linear regression was used: age, weight, size, metabolite z-scores, each genotype of the polymorphisms studied, the presence of smokers at home, presence of erythrocytes in urine, presence of bacteria in urine, hematocrit, distance from the Atoyac River or its channels to their home were analyzed and those yielding a  $P$  value  $\leq 0.2$  were selected to construct a generalized linear model (GLM).  $\ln$ OSI was used for these analyses. Variables used in the GLM using only the data from Tepetitla, were: age, distance from the river or its channels (in meters), metabolite z-score, *NQO1 C609T* homozygous *CC* and *CYP2E1 RsaI* homozygous *c2* genotype, and *GSTT1 present*. The explanatory model for OSI was considered for variables with a  $P < 0.05$ . This model was applied in the analysis for the other community, Ixtenco, to establish differences between them.

## RESULTS

### Anthropometric and Sociodemographic Characteristics of the Individuals Studied

These characteristics are presented in Table IV for each of the communities studied, which are very similar in socioeconomic classification. A significant difference was found in the age of the children studied in each community, both boys and girls ( $P < 0.05$ ), being one year



**TABLE III. Primers Used to Identify Metabolic Polymorphism by PCR and Reaction Conditions**

Polymorphism	Forward primer	Reverse primer	Restriction enzyme/ time/temperature
CYP2E1 RsaI	5'CCAGTCGAGTCTACATTGT 3'	5'TCCATTCTGTCTTCTAACT 3'	RsaI/24 hs/37°C
NQO1 C609T	5'CCTCTCTGTGCTTTCTGTATC 3'	5'GATGGACTTGCCCAAGTGATG 3'	HinfI/20hs/37°C
GSTM1	5'CTGCCCTACTTGTTGATTGATGGG 3'	5'CTGGATTGTAGCAGATCATGC 3'	None
GSTT1	5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	5'TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	None
<b>Reaction conditions</b>	<b>CYP2E1 RsaI</b>	<b>NQO1 C609T</b>	<b>GSTM1-GSTT1</b>
Denaturation	94°C–3 min	94°C–3 min	94°C–2.5 min
Cycles	94°C–30 sec 56°C–30 sec 72°C–30 sec	94°C–30 sec 62°C–30 sec 72°C–30 sec	94°C–1 min 52°C–1 min 72°C–1 min
Final extension	72°C–3 min	72°C–3 min	72°C–9 min
Number of cycles	30	35	30
<b>Genotype identification</b>			
Wilde type	Two bands: 360 and 50 bp	Two bands: 214 and 85 bp	Band present: 273 bp and
Heterozygotes	Three bands: 410, 360, and 50 bp	Four bands: 214, 151, 85, and 63 bp	480 bp, respectively
Homozygous mutants	One band: 410 bp	Three bands: 151, 85, and 63 bp	Absent band for null polymorphism

**TABLE IV. Anthropometric and Sociodemographic Data of the Groups Studied**

Data	Ixtenco		Tepetitla	
No. of samples	48	45	44	47
Sex	Male	Female	Male	Female
Age (years)	9.8 ± 1.3	9.5 ± 1.3	10.5 ± 1.4	10.5 ± 1.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	18.0 ± 3.5	18.1 ± 2.8	16.9 ± 2.3	18.5 ± 2.9
Weight (Kg)	35.2 ± 9.8	33.8 ± 8.4	34.0 ± 6.9	38.1 ± 8.4
Height (cm)	138.8 ± 8.6	135.7 ± 9.0	141.1 ± 10.5	142.9 ± 8.1
Men: Women (%)	52:48		48:52	
Degree of marginalization (CONAPO 2010)	Medium		Medium	
Ethnicity	Mestizos		Mestizos	
Nutrition type	Mixed (Varied)		Mixed (Varied)	
Distance to the Atoyac River or channels	More than 7 km		No farther than 500 m	

older in general in Tepetitla. A significant difference was also found in height between girls in each community ( $P < 0.05$ ), but not between boys, being taller the girls in Tepetitla, and in BMI, there being a significant difference between boys of each community, being lower in Tepetitla ( $P < 0.05$ ). However, these differences did not affect the biomarkers measured.

#### TAC, TOS, OSI

Oxidative status parameters are shown in Table V, where it may be observed that the median value for TAC in the group of children from Tepetitla is significantly lower than that of children from Ixtenco (Fig. 2a), whereas no significant difference was found with TOS values (Fig. 2b). OSI median value was significantly higher in children from Tepetitla (4.91) living near the river, compared to children from Ixtenco (2.28), living at a distance from the river (Fig. 2c), CI 95%.

#### BTEX Metabolites in Urine

Median values found for BTEX metabolites are shown in Table V. *O*-cresol (for toluene exposure) values in Tepetitla

were significantly higher than in Ixtenco, whereas methylhippuric and PMAs (for xylene and benzene exposure) were very similar between the two groups. Ethylbenzene metabolites (mandelic and phenyl-glyoxylic acids) were significantly higher in Ixtenco than in Tepetitla. Exposure to xylenes never exceeded the BEI levels considered by ACGIH, whereas exposure to toluene, benzene and ethylbenzene proved to be of importance for both populations as is shown in Figure 3, where 26% of the children from Tepetitla showed elevated levels of *o*-cresol, compared to 12% of children from Ixtenco; 15% and 18% of children from Tepetitla and Ixtenco excreted elevated levels of PMA, respectively, and 5% of children in Tepetitla and 27% of children in Ixtenco, excreted ethylbenzene metabolites exceeding recommended BEI values.

#### Allelic and Genotype Frequencies of CYP2E1 RsaI, NQO1 C609T, GSTM1 Null, and GSTT1 Null Polymorphisms

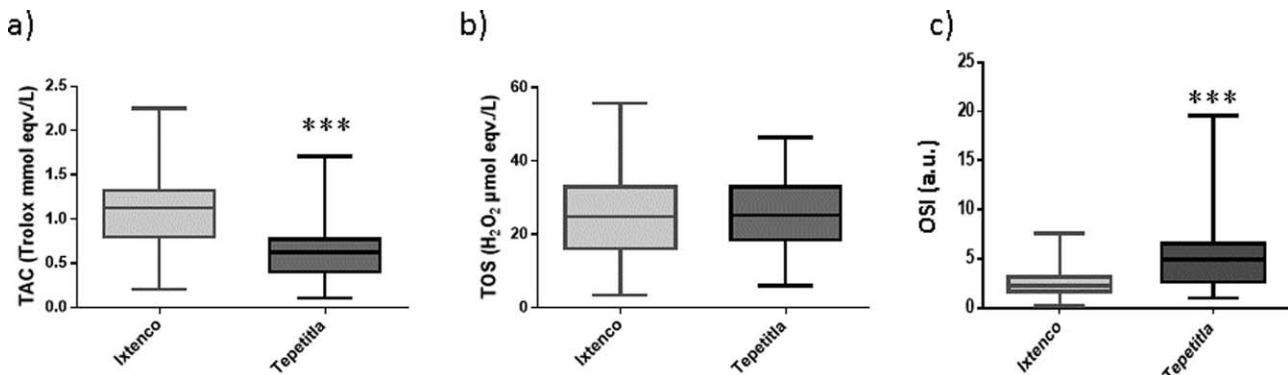
Frequencies found for each allele or genotype are presented in Table VI. The mutant allele for *CYP2E1 RsaI*

**TABLE V.** Total Antioxidant Capacity, Total Oxidative Status, Oxidative Stress Index Measured in Plasma, and Levels of BTEX Metabolites Measured in Urine, by Each Community Studied

Population	TAC (Trolox mmol eqv/L)		TOS (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol eqv./L)		OSI (a.u.) <sup>b</sup>		<i>o</i> -cresol (mg/g creatinine)		MHA (g/g creatinine)		s-PMA (μg/g creatinine)		PGA & MA (mg /g creatinine)	
	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp	Ix	Tp
Mean ± SD	1.1 ± 0.42	0.65 ± 0.33	24.9 ± 10.7	25.9 ± 9.4	2.6 ± 1.5	5.2 ± 3.4	0.08 ± 0.15	0.16 ± 0.25	0.16 ± 0.11	0.13 ± 0.09	9.7 ± 25.3	6.1 ± 12.8	135.0 ± 153.7	37.5 ± 122.8
Median	1.1	0.62	24.9	25.3	2.3	4.9	0	0	0.14	0.04	0	0	75.2	7.9
Min	0.20	0.11	3.5	6.1	0.21	0.96	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	2.3	1.7	55.7	46.5	7.5	19.6	0.47	1.1	0.49	0.80	160.4	57.6	700.4	809.3
<i>P</i>	0.0001 <sup>a</sup>		0.26		0.0001 <sup>a</sup>		0.03 <sup>a</sup>		0.0001 <sup>a</sup>		0.18		0.0001 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Values significantly different between communities.

<sup>b</sup>Arbitrary units. Ix, Ixtenco; MA, mandelic acid; MHA, methyl hippuric acid; PGA, phenylglyoxilic acid; s-PMA, s-phenylmercapturic acid; Tp, Tepetitla.



**Fig. 2.** Box plots of the distribution of oxidative stress parameter in each site studied: (a) total antioxidant capacity; (b) total oxidative status; (c) oxidative stress index. Asterisks mean a significant difference between sites, Mann-Whitney *U* test,  $P = 0.0001$ .

(*c2*) showed a frequency of 0.23 and 0.27 in Ixtenco and Tepetitla, respectively,  $P = 0.281$  chi square test. The mutant allele of *NQO1 C609T (T)* had a frequency of 0.54 in Ixtenco and 0.47 in Tepetitla,  $P = 0.198$ , chi square test. The *null* genotype of *GSTM1* was found with a frequency of 0.35 in Ixtenco and 0.4 in Tepetitla,  $P = 0.566$ , chi square test, and the *null* genotype of *GSTT1* showed a frequency of 0.11 in Ixtenco and 0.07 in Tepetitla,  $P = 0.408$ , chi square test. These frequencies are consistent with previous reports on this population and the Mexican population in general [Montero et al., 2003, Mendoza-Cantú et al., 2004, Montero et al., 2007, Pérez-Morales et al., 2008].

#### General z-Scores for BTEX Metabolite Concentrations in Urine and Correlation with OSI

The general z-scores of metabolites for BTEX exposure distributed in an analogous manner in the two groups of children studied, with a  $P = 0.7788$ , Mann-Whitney *U*. Nonetheless, a linear regression analysis showed a significant negative correlation between OSI and the z-scores in

Tepetitla ( $P = 0.027$ , coefficient  $-0.059$ ), whereas no correlation was found between these variables in Ixtenco ( $P = 0.791$ ) (Fig. 4).

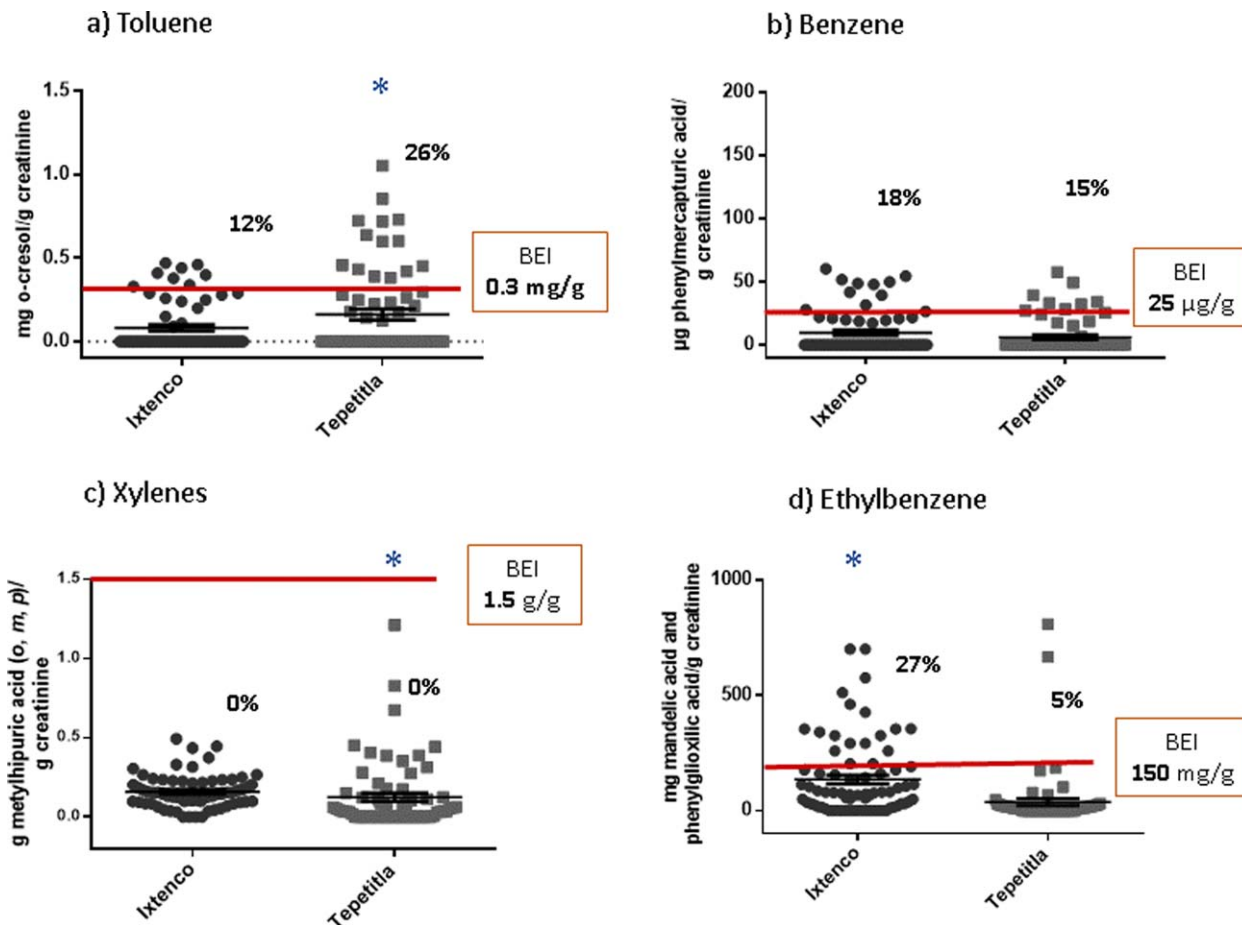
#### Lasso Selection for Genotypes of Interest

With this test, correlations between polymorphisms and OSI were found only for the Tepetitla group, whereas in Ixtenco no correlations were found. A correlation was observed between *CYP2E1*, *NQO1*, and *GSTT1* and increased OSI, particularly in the following genotypes: *CYP2E1 RsaI (c2c2)* and *NQO1 C609T (CC)*, with  $\beta$  values of 1.3047 and 0.7687, respectively, and *GSTT1* when the gene is *present*, with a  $\beta$  value of 1.2328.

#### OSI Correlation with Other Variables in the Generalized Linear Model (GLM)

All data were used in an initial GLM, where the most predictive variable for OSI clearly was the *community* ( $P = 0.00001$ ). Therefore, other GLM were performed separately for each community, and it was found that the model explaining OSI (AIC = 1.915) in Tepetitla was





**Fig. 3.** BTEX metabolites in the two sites studied. The biological exposure index (BEI - ACGIH) is depicted with the thick line. Percentage numbers indicate the amount of samples exceeding BEI values. Asterisks indicate significant differences between sites, Mann-Whitney *U* test, *P* < 0.05.

**TABLE VI.** Frequencies of Alleles or Genotypes of the Corresponding Polymorphisms Studied

Polymorphism	Frequency in Ixtenco	Frequency in Tepetitla	<i>P</i> <sup>a</sup>
CYP2E1 RsaI allele c2	0.23	0.27	0.28
NQO1 C609T allele C	0.46	0.53	0.19
GSTM1 null genotype	0.35	0.40	0.57
GSTT1 functional genotype	0.89	0.93	0.41

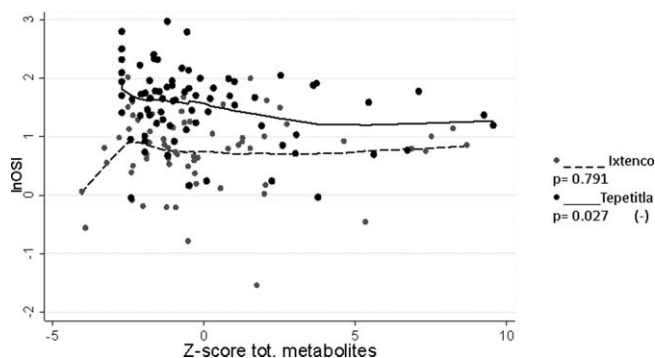
<sup>a</sup>Chi square test shows that frequencies are not significantly different.

constituted in the following manner: general z-score of BTEX metabolites (*P* = 0.024), with negative correlation; *CYP2E1 RsaI* (*c2c2*) genotype (*P* = 0.039) and *GSTT1 present* (*P* = 0.024), as well as *NQO1 C609T* (*CC*) genotype (*P* = 0.011) (Table VII). According to these results, a child in Tepetitla with a low level of urine BTEX metabolites, would present an elevated OSI, as would children with either *CYP2E1 RsaI c2c2* genotype, *GSTT1 present* or the *NQO1 C609T* (*CC*) genotype. It should be noted that z-scores of BTEX metabolites did not show a

correlation with genetic polymorphisms. The same model applied to the data of Ixtenco did not show any of these correlations (Table VII).

**DISCUSSION**

Polluted rivers have been studied for the risk they represent for human health. Modern “development” in emerging economies is having an impact on surface water



**Fig. 4.** Correlation between OSI and the z-core of BTEX metabolites. A significant negative correlation was found with data in ( $P = 0.027$ ) Tepetitla, whereas there was no correlation with data in Ixtenco. This is depicted in a nonlinear manner to enhance the difference.

**TABLE VII. Parameters that Correlated with OSI Values in the Generalized Linear Model for the Communities Studied**

OSI	Coef.	Std. Err.	$P > z$	95% CI	
<b>TEPETITLA</b>					
z-score for metabolites	-0.06	0.03	0.02	-0.11	-0.01
<i>CYP2E1 RsaI (c2c2)</i>	0.49	0.24	0.04	0.02	0.95
<i>GSTT1 positive</i>	0.61	0.27	0.02	0.08	1.1
<i>NQO1 C609T (CC)</i>	0.35	0.14	0.01	0.08	0.62
AIC = 1.9					
<b>IXTENCO</b>					
z-score for metabolites	0.01	0.03	0.75	-0.05	-0.06
<i>CYP2E1 RsaI (c2c2)</i>	0.59	0.48	0.22	-0.36	1.5
<i>GSTT1 positive</i>	0.15	0.25	0.55	-0.35	0.65
<i>NQO1 C609T (CC)</i>	-0.31	0.24	0.09	-0.67	1.2
AIC = 2.1					

receiving a mixture of chemicals whose toxic and harmful effects are well-documented, including endocrine disruption, carcinogenicity, neurotoxicity, immunosuppression and a wide variety of toxic impacts, affecting the quality of life of people living near these places, and the development of children who are born in less than hygienic environmental conditions. The impact on health was foreseen by Vineis and Xun [2009] who predicted the onset of a cancer epidemic in developing countries due to this accelerated process of industrialization. To give an example, Mexico is the Latin American country with the highest incidence of childhood leukemia, as reported by Curado et al. [2011].

In the area of our study, there is little data available regarding the incidence of cancer in the population, however, the perception of people living in the communities on the banks of the Atoyac is that children get sick with anemia, leukemia, dermatological and renal disorders, diseases that were unknown to the elderly and to the parents. This has been occurring since the turn of the 21st century, as populations are exposed to industrial emissions to the air and to the wastes discharged into the river, particularly, volatile compounds. Since adults often are also

exposed at work, our study was aimed at characterizing early biological effects in children who were born and are growing up in these settings.

The oxidative stress index was selected as a biomarker, since it is an approach where a systemic status can be evaluated in the blood plasma of individuals. Metabolism of xenobiotic chemicals may result in the production of ROS with the potential to harm tissues of living organisms, which of course, possess antioxidative mechanisms to avoid damage, but that in a chronic exposure situation, could lose the balance between oxidants and antioxidants, shifting towards an oxidative status. The result is the onset of oxidative stress, which is associated with a large number of health problems including cancer and cardiovascular disease [Bhattacharyya et al., 2014; Smith et al., 2016].

In this study, children living on the banks of an intensely polluted river exhibited an antioxidant capacity (TAC) significantly lower than that found among children of an agricultural community; these results are comparable to those found by Kosecik et al. [2005], Aycicek et al. [2005], and Yildirim et al. [2011] who also found a significantly diminished TAC in children and infants passively exposed to tobacco smoke. They are also coincident with the results found in an animal model administered a mixture of VOCs (chloroform, methylene chloride and toluene) which exhibited a reduced antioxidant capacity after three days of treatment, involving diminished superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities, which were associated with lipoperoxidation [Belmont-Díaz et al., 2014]. As Erel's [2004] findings in a similar context suggest, the reduced antioxidant capacity found in the plasma of the children studied in Tepetitla may be due to a reduced amount of sulfhydryl groups and vitamin C deficiency.

Diet could be critical in this context, although the two communities reported a similar diet containing the same amount of meat, vegetables and fruit consumption, as well as a similar frequency of junk-food intake. According to tables provided by the FANTA project [2013], children in the communities generally had normal BMI, however, differences were found in the way this is distributed, being higher in Ixtenco than in Tepetitla ( $P = 0.024$ , chi square) (Table IV). This was most notable among the boys, with a mean BMI of  $16.95 \pm 2.27$  in Tepetitla, vs.  $18.47 \pm 3.49$  in Ixtenco ( $P = 0.01$ , Fisher exact test), the former being older by 10.48 vs. 9.77 years old. Under these circumstances, perhaps the boys of Tepetitla would benefit from a higher consumption of protein and citrus, or even of dietary supplements, such as folic acid, which they do not normally use. It should be recalled that only children without known illnesses who regularly attend school were included in the study, which suggests that even when their TAC was

diminished, they were able to maintain homeostasis, keeping them functional and healthy for the moment.

Levels of specific VOC were measured prior to obtaining blood and urine samples in the communities. The levels found for all the BTEX are under the reference levels recommended by EPA-IRIS for noncarcinogenic effects in the environment (Supporting Information S2), however, benzene levels are in the range of increasing the risk of leukemia by one order of magnitude [US-EPA, 2012]. Furthermore, as Bolden et al. [2015] indicate, all the compounds reached levels that have been reported in studies worldwide in association with health effects mainly affecting the immune and respiratory systems, the reticuloendothelial tissue, the skin, and the developing embryo, about which there is little data available for the communities studied.

With this in mind, BTEX metabolites were used to obtain an estimation of the levels of exposure in each community, considering that other VOC and toxic compounds are also present. Given the amount of metabolites measured, it would appear that exposure in Tepetitla and Ixtenco was very similar, however, a 2:1 ratio of these contaminants had been determined in air (Supporting Information S2), and a significantly diminished TAC was found in children from Tepetitla, hence, a significantly increased OSI was also present in these children. Could it be that the diminished TAC interfered with detoxification of these compounds? The negative correlation found between the total z-scores of metabolites and the OSI data from Tepetitla suggests this is the case, whereas no correlation was found with data from Ixtenco. The explanation could be, again based on the results of the animal model by Belmont-Díaz et al. [2014], that increased metabolism by CYP2E1 may have increased the generation of ROSs and electrophilic metabolites such as quinones and epoxides [Cederbaum et al., 2009; Rappaport et al., 2010], exceeding the ability of the organism to inactivate them, and hence to excrete them. Contributing to this idea are the results by Jiménez-Garza et al. [2015] who described that toluene-exposed workers show hypomethylation in the promoter region of *CYP2E1* which is related to an increased expression of mRNA, possibly increasing the activity of the enzyme, thus triggering oxidative stress, as observed above.

There is another possibility, however, and this has to do with the levels of VOC mixture in the environment. If they were high enough, a competitive metabolic inhibition could occur, as has been described in pharmacokinetic models, where CYP2E1, the first metabolic step, gets saturated, giving way to alternative paths of biotransformation and excretion [ATSDR, 2004] where other isoforms of CYP450 could participate producing other metabolites, thus contributing to the detoxification of the organism, or conversely, generating more oxidative

species that could contribute to increase the oxidative stress status observed.

In any case, the result was that children in Tepetitla, with an already diminished TAC, excreted less BTEX metabolites, concomitant with an increased oxidative stress status, compared to the children in Ixtenco. The possibility that important detoxification pathways are being exceeded by the challenges present in this environment for the child population must be taken seriously and solutions must be applied related to environmental standards; still other research has been conducted on this subject [Bolden et al., 2015, Landrigan et al., 2018]. As Bolden et al. [2015] has warned: toxic compounds at exposure levels below those taken as a reference may nonetheless exert important biological effects that are related to chronic, noncommunicable diseases, such as sperm abnormalities, reduced fetal growth, cardiovascular disease, respiratory dysfunction, asthma, sensitization to common antigens, and others, characteristic of transitional locations such as Tepetitla and many others in developing countries.

In another aspect of this study, increased metabolism by CYP2E1 could be attributed both to the induction of the enzyme due to chronic exposure to VOC contaminants, and/or to the presence of the allele *c2* in homozygous form, which in Tepetitla was associated with an increased OSI, as were the functional genotypes of *GSTT1* and *NQO1 C609T*. The contribution of *GSTT1* to an oxidative state has been documented by Oh et al. [2002] and Olvera-Bello et al. [2010], who described the participation of *GSTT1* in the activation of dihaloalkane VOC-like dichloromethane which has been detected in the polluted river. In relation to *NQO1*, it may function as a detoxification enzyme or as a toxification system, depending on the substrate [Ross and Siegel, 2004], which in this case is unknown due to the mixture of contaminants present in the area; but if quinone is the substrate, hydroquinones formed due to the action of *NQO1* are not necessarily innocuous and could generate ROS by autooxidation or rearrange to produce reactive arylating species [Ross and Siegel, 2004], contributing to an increase in the oxidative status of the organisms, particularly if the antioxidant defense is diminished. Metabolic polymorphisms are genes with low penetrance, provided the environmental pressures remain low [Vineis et al., 1999]; when exposure to toxic compounds is chronic, it is to be expected that the effect of these allelic variations would be evident, thus explaining why they correlate with OSI values in Tepetitla and not in Ixtenco.

Given the occurrence of the polymorphisms observed in this population, these results are a warning for health authorities. The frequency of the *c2c2* genotype of CYP2E1 was 0.09; it was 0.32 for functional homozygous *NQO1\*2* genotype (CC) (these genotype frequencies are not shown in the tables, but only allelic frequencies), and 0.93 for functional *GSTT1* (both homozygous and heterozygous). If individuals carrying two or three of these

**TABLE VIII. Frequency of the Susceptible Polymorphisms Found in this Study, in Different Human Groups**

Polymorphism	Human group	Susceptible allele/genotype frequency	Reference
CYP2E1 RsaI (c2 allele, mutant)	European	0.02 - 0.03	Vodicka et al. [2004]
	Asiatic	0.24	Kato et al. [1992]
	African-American	0.05	Kato et al. [1992]
	Mexican	0.21	Mendoza et al. [2004]
	Mexican	0.23–0.27	This paper
NQO1*2 (C allele, native)	European	0.77–0.81	Stanulla et al. [2007], Jamieson et al. [2007]
	Asiatic	0.44–0.65	Huang et al. [2007], Lu et al. [2007]
	African	0.78–0.86	Momary et al. [2007], Ouerhani et al. [2013]
	Native Canadian	0.57	Gaedigk et al. [1998]
	Canadian	0.84	Gaedigk et al. [1998]
	Mexican	0.46–0.53	This paper
GSTT1*0 (functional genotype)	European	0.74–0.82	Vodicka et al. [2004], Yang et al. [2006]
	Asiatic	0.53	Yang et al. [2006]
	African-American	0.76	Chen et al. [1997]
	Mexican	0.89–0.93	Montero et al. [2007], Pérez et al. [2008]

susceptible genotypes are considered, a proportion of 0.32 of people are susceptible to this kind of environment, carrying two of these genotypes, and the proportion of those most susceptible is 0.03, carrying three susceptible genotypes, for a total of 0.35, too high for any population, let alone children. Compared to other groups in the world, allelic frequencies of these particular polymorphisms are different in Mexican populations, which are more similar to Asians than Europeans, Africans or African-Americans (see Table VIII for comparison).

In summary, healthy children who were born in an area highly contaminated by industry, presented an increased oxidative stress index associated with a diminished antioxidant capacity, a diminished metabolite excretion of VOC and with allelic variants of the metabolic polymorphisms of *CYP2E1 RsaI*, genotype *c2c2*, *GSTT1 present* and functional *NQO1 C609T*, genotype *CC*. Moreover, although their anthropometric parameters were within normal values, boys in Tepetitla exhibited a diminished BMI compared to boys from the other community who were younger.

These results have been discussed in scientific forums and efforts have been made to work with NGOs, the National Human Rights Commission and this University's faculty of Economics to make local and state environmental and health authorities aware that it is possible to effectively regulate the discharge of industrial waste into the environment to protect public health without hampering economic development, since new water recovery and toxic compound filtration technologies preventing air pollution already exist, meaning that harm to natural resources and public health is no longer a *conditio sine qua non* for achieving economic development [Stern, 2004].

In relation to further studies, another aspect of this research is still being analyzed, relating genotoxic parameters in the same children. Also, collaboration with public health personnel will be sought to do an intervention

study to improve the diet of a group of children from Tepetitla with a greater content of antioxidants, and measure their biomarkers of oxidative stress and micronuclei to ascertain whether the damage caused by the environmental pollution could be thus attenuated.

#### CONCLUDING REMARKS

The environmental situation of this and many other small, formerly rural communities in developing countries, is not sustainable because it is neither compatible with health nor well-being. The expected health problems for these children as they grow older involves a wide array of disorders as explained above, including reproductive and fertility risks for them and their children. Protection programs must be designed that include a constant monitoring of early biological effects, at the same time that environmental protection measures are applied to halt the deterioration of fundamental resources for a healthy life: clean air and clean water.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Javier Espinosa and M.Sc. Sandra L. Hernández for facilitating the use of their laboratory equipment and support in the determinations of TAC and TOS. To M. Sc. Paulina López-Gordillo for her collaboration in the standardization of TAC and TOS determinations. To Vet. Luis Serrano-García for his support in the laboratory work to determine metabolic polymorphisms. To the enthusiastic staff at Centro Fray Julián Garcés, the Coordinator for a Living Atoyac and of the Network of Youngsters for People's Defense for their assistance in applying the questionnaires in Tepetitla and Ixtenco. This study was supported with funds from the Universidad Nacional Autónoma de México. CONACYT provided a fellowship for Rocío López-Vargas, a student of the Ph.D. Program of



Biological Science (number 259598). We also would like to thank The Children's Environmental Health Network from CONACYT (251229/271626), for supporting Rocío López-Vargas's attendance at the International Congress of Toxicology in Mérida, 2016.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## STATEMENT OF AUTHOR CONTRIBUTIONS

Drs. Montero and Arellano designed the study. Dr. Montero applied for Research Ethics Board approval and coordinated all the activities related to the study. Dr. Montero and M. Sc. López-Vargas recruited the donors, with the collaboration of Méndez-Serrano and García-Vargas from Centro Fray Julián who also participated in the application of the questionnaire in the communities. Dr. Montero and M.Sc. López-Vargas prepared data, figures and tables.

M. Sc. López-Vargas—collected samples, processed samples for TOS, TAC and metabolic polymorphisms determinations for *CYP2E1* and *NQO1*. She also took the samples to Nanchital laboratory and worked with Drs. Oropeza, Alvarado and Mercado in the determination of metabolites in urine. She assembled the results and prepared the statistical analysis with the advice of Dr. Hernández-Cadena. She also discussed the results with Drs. Albores, Hernández-Cadena and Montero.

Dr. Albores provided valuable commentaries and discussions about the design and the interpretation of results, in collaboration with M.Sc. López-Vargas.

Dr. Arellano participated in the studies of the quality of water which are presented as Supporting Information. Biol. Herrera determined metabolic polymorphisms for *GSTT1* and *GSTM1*.

Dr. Montero prepared the manuscript with the material provided by M.Sc. López-Vargas, by Dr. Arellano and with the intellectual input from M.Sc. López and Dr. Albores.

## REFERENCES

- ACGIH. 2015. TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposures indices. In: Signature publications.
- Arellano-Aguilar O, Solís-Angeles S, Serrano-García L, Morales-Sierra E, Méndez-Serrano A, Montero-Montoya R. 2015. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: Case study. *J FisheriesSciences.com* 9:52–62.
- ATSDR – Toxic substances portal; <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/index.asp> Accessed Feb. 2018.
- ATSDR. 2004. Interaction profile for: Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). US Department of Health and Human Services.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. 2005. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int* 47:635–639.
- Belmont-Díaz J, López-Gordillo AP, Molina Garduño E, Serrano-García L, Coballase-Urrutia E, Cárdenas-Rodríguez N, Arellano-Aguilar O, Montero-Montoya RD. 2014. 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. *Biomed Res Int* 2014:425070.
- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. 2014. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 94:329–354.
- Bind MA, Coull B, Suh H, Wright R, Baccarelli A, Vokonas P, Schwartz J. 2014. A novel genetic score approach using instruments to investigate interactions between pathways and environment: Application to air pollution. *PLoS One* 9:e96000.
- Bolden AL, Kwiatkowski CF, Colborn T. 2015. New look at BTEX: Are ambient levels a problem?. *Environ Sci Technol* 49:5261–5276.
- Castillo DL. 2014. Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesado en bacterias mesofílicas como indicador biológico de contaminación en ríos del municipio de Puebla. BUAP. <http://benem-mt.iii.com/iii/cpro/DigitalItemViewPage.external?lang=spi&sp=1002248&sp=T&sp=P20%2Call%2CRu1000001%40%2CQmaestr%20C3%ADa+en&suite=def>
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 83:519–548.
- Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, Evans WE, Relling MV. 1997. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89:1701–1707.
- Chia SE, Goh VH, Ong CN. 1997. Endocrine profiles of male workers with exposure to trichloroethylene. *Am J Ind Med* 32:217–222.
- CONAGUA-SEMARNAT. 2011. DOF (Official Diary of the Federation), Declaratoria de clasificación de los ríos Atoyac y Xochiac o Hueyapan, y sus afluentes. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5199672&fecha=06/07/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5199672&fecha=06/07/2011) Accessed January 2018.
- CONAPO (National Council of Population). [http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/indices\\_margina/mf2010/CapitulosPDF/Anexo%20B3.pdf](http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/indices_margina/mf2010/CapitulosPDF/Anexo%20B3.pdf) Accessed February 2018.
- Curado MP, Pontes T, Guerra-Yi ME, Cancela MC. 2011. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica* 29:96–102.
- Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K, Yabe H, Mizutani S, Greaves 2005. The association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 90:1511–1515.
- EPA – Benzene Hazard Summary; <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/benzene.pdf> Accessed February 2018.
- EPA-IRIS Advanced Search. Available at: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?first\\_letter=B](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?first_letter=B) Accessed January, 2018.
- Erel O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 37: 112–119.
- Erel O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38:1103–1111.
- FANTA III (Food and Nutrition Technical Assistance) [https://www.fantaproject.org/sites/default/files/resources/FANTA-BMI-charts-Enero2013-ESPANOL\\_0.pdf](https://www.fantaproject.org/sites/default/files/resources/FANTA-BMI-charts-Enero2013-ESPANOL_0.pdf) Accessed February, 2018.
- Gaedigk A, Tyndale RF, Jurima-Romet M, Sellers EM, Grant DM, Leeder JS. 1998. NAD(P)H:quinone oxidoreductase: Polymorphisms and allele frequencies in Caucasian, Chinese and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics* 8: 305–313.
- Greenpeace México. 2014. Ríos tóxicos: Lerma y Atoyac, la historia de negligencia continúa. Available in: <http://www.greenpeace.org/>

- me4x4i4co/Global/mexico/Docs/2014/toxicos/Rios%20t%20C3%B3-xicos%20Lerma%20y%20Atoyac-WEB.pdf
- Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. 1991. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 110:559–565.
- Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. 1993. The GSTM1-null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 14:1479–1481.
- Huang YS, Su WJ, Huang YH, Chen CY, Chang FY, Lin HC, Lee SD. 2007. Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol* 47:128–134.
- Hunter J, Hamilton M. 2002. The advantages of using standardized scores in causal analysis. *Hum Commun Res* 28:552–561.
- IMTA & CONAGUA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y Comisión Nacional del Agua). 2008. Evaluación del Riesgo Sanitario-Ambiental de las Zonas Aledañas al Río Atoyac. Executive summary.
- Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S, Margetts JP, Edmondson RJ, Leung HY, Knox R, Boddy AV. 2007. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and nrh:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an NQO2 exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res* 13:1584–1590.
- Jiménez-Garza O, Baccarelli A, Byun H-M, Márquez-Gamiño S, Barrón-Vivanco B, Albores A. 2015. CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit. *Toxicol Appl Pharmacol* 286:207–215.
- Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC. 1992. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 52:6712–6715.
- Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. 2005. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 100:61–64.
- Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, Baldé AB, Bertollini R, Bose-O'Reilly S, Boufford JI, Breyse PN, Chiles T, Mahidol C, Coll-Seck AM, Cropper ML, Fobil J, Fuster V, Greenstone M, Haines A, Hanrahan D, Hunter D, Khare M, Krupnick A, Lanphear B, Lohani B, Martin K, Mathiasen KV, McTeer MA, Murray CJL, Ndahimananjara JD, Perera F, Potočnik J, Preker AS, Ramesh J, Rockström J, Salinas C, Samson LD, Sandilya K, Sly PD, Smith KR, Steiner A, Stewart RB, Suk WA, van Schayck OCP, Yadama GN, Yumkella K, Zhong M. 2018. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 391:462–512. Review. No abstract available. Erratum in: *Lancet*. 2018 Feb 3;391(10119):430.
- Lu Y, Kham SK, Foo TC, Ariffin H, Quah TC, Yeoh AE. 2007. Genotyping of eight polymorphic genes encoding drug-metabolizing enzymes and transporters using a customized oligonucleotide array. *Anal Biochem* 360:105–113.
- Mendoza-Cantú A, Castorena-Torres F, Bermudez M, Martínez-Hernández R, Ortega A, Salinas JE, Albores A. 2004. Genotype and allele frequencies of polymorphic cytochromes P450 CYP1A2 and CYP2E1 in Mexicans. *Cell Biochem Funct* 22:29–34.
- Momary KM, Shapiro NL, Viana MA, Nutescu EA, Helgason CM, Cavallari LH. 2007. Factors influencing warfarin dose requirements in African-Americans. *Pharmacogenomics* 8:1535–1544.
- Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía V, Serrano L, Albores A, Salinas JE, Camacho R. 2007. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and Cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol* 79:299–312.
- Montero R, Serrano L, Araujo A, Dávila V, Ponce J, Camacho R, Morales E, Méndez A. 2006. Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: Comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 21:335–342.
- Montero R, Serrano L, Dávila V, Segura Y, Arrieta A, Fuentes R, Abad I, Valencia L, Sierra P, Camacho R. 2003. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mut* 42:216–222.
- Navarro I, Flores E, Valladares R. 2004. Estudio Ambiental. Informe. In: Morales Eduardo (ed.), *Ambiente y Derechos Humanos*. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local A.C., Tlaxcala, Tlax. 27–59.
- NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 2003. Fourth Edition. HIPPURIC and METHYL HIPPURIC ACIDS in urine. METHOD 8301, Issue 3: 2–5.
- NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 2014. Fifth Edition. S-Benzylmercapturic acid and S-phenylmercapturic acid in urine: METHOD 8326, Issue 1: 2–10.
- NIOSH. 1994. Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition. PHENOL and p-CRESOL in urine: METHOD 8305, Issue 2: 2–4.
- Ogata M, Sugihara R. 1978. High performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of urinary phenylglyoxylic, mandelic, and hippuric acids as indices of styrene exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 42:11–19.
- Oh SJ, Kim SK, Kim YC. 2002. Role of glutathione in metabolic degradation of dichloromethane in rats. *Toxicol Lett* 129:107–114.
- Olvera-Bello AE, Estrada-Muñiz E, Elizondo G, Vega L. 2010. Susceptibility to the cytogenetic effects of dichloromethane is related to the glutathione S-transferase theta phenotype. *Toxicol Lett* 199:218–224.
- Ouerhani S, Cherif N, Bahri I, Safra I, Menif S, Abbas S. 2013. Genetic polymorphisms of NQO1, CYP1A1 and TPMT and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in a Tunisian population. *Mol Biol Rep* 40:1307–1314.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271–276.
- Pérez-Morales R, Castro-Hernández C, Gonsébat ME, Rubio J. 2008. Polymorphism of CYP1A1\*2C, GSTM1\*0, and GSTT1\*0 in a Mexican Mestizo population: A similitude analysis. *Hum Biol* 80:457–465.
- Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Li G, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, Yin S, Smith MT, Rothman N. 2010. Human benzene metabolism following occupational and environmental exposures. *Chem Biol Interact* 184:189–195.
- Ross D, Siegel D. 2004. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol* 382:115–144.
- Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, DeMarini DM, Caldwell JC, Kavlock RJ, Lambert PF, Hecht SS, Bucher JR, Stewart BW, Baan RA, Coglianò VJ, Straif K. 2016. Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 124:713–721.
- Stanulla M, Dnybil C, Bartels DB, Dördelmann M, Löning L, Claviez A, Schrappe M. ALL-BFM Study Group. 2007. The NQO1 C609T polymorphism is associated with risk of secondary malignant neoplasms after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: A matched-pair analysis from the ALL-BFM study group. *Haematologica* 92:1581–1582.
- Stern DI. 2004. The rise and fall of the environmental Kuznets curve. *World Dev* 32:1419–1439.

- Tachachartvanich P, Sangsuwan R, Ruiz HS, Sanchez SS, Durkin KA, Zhang L, Smith MT. 2018. Assessment of the endocrine-disrupting effects of trichloroethylene and its metabolites using in vitro and in silico approaches. *Environ Sci Technol* 52:1542–1550.
- Tibshirani R. 1996. Regression shrinkage and Selection via the Lasso. *J R Stat Soc Series B (Methodological)* 58:267–288.
- US-EPA. Integrated Risk Information System on Benzene. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, D.C., 2012. Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/benzene.pdf> Accessed January, 2018
- Versonnen BJ, Arijis K, Verslycke T, Lema W, Janssen CR. 2003. In vitro and in vivo estrogenicity and toxicity of o-, m-, and p-dichlorobenzene. *Environ Toxicol Chem* 22:329–335.
- Vineis P, Xun W. 2009. The emerging epidemic of environmental cancers in developing countries. *Ann Oncol* 20:205–212.
- Vineis P, Malats N, Boffetta P. 1999. Why study metabolic susceptibility to cancer? *IARC Sci Publ* 148:1–3.
- Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Musak L, Soucek P, Haufroid V, Sasiadek M, Vodickova L, Naccarati A, Sedikova J, Sanyal S, Kuricova M, Brsiak V, Norppa H, Buchancova J, Hemminki K. 2004. Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant. *Environ Mol Mutagen* 44:283–292.
- Yang X, Pfeiffer RM, Goldstein AM. 2006. Influence of glutathione-S-transferase (GSTM1, GSTP1, GSTT1) and Cytochrome P450 (CYP1A1, CYP2D6) polymorphisms on numbers of basal cell carcinomas (BCCs) in families with the naevoid basal cell carcinoma syndrome. Electronic letter. *J Med Genet* 43:e16.
- Yildirim F, Sermetow K, Aycicek A, Kocyigit A, Erel O. 2011. Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking. *J Pediatr (Rio J)* 87:523–528.

*Accepted by—*  
U. Vogel