

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“BIOMONITOREO GENOTÓXICO DE POBLACIONES EXPUESTAS A
SITIOS CONTAMINADOS USANDO CÉLULAS DE HUMANOS”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

CLAUDIA CARRANZA RETANA

DIRIGIDA POR:

DR. GUILLERMO CABRERA LÓPEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE 2001.

**BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
“ROBERTO RUIZ OBREGÓN”**

No. Adq. H 66201
No. Título TS
Clas. 615.902
C311b.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“BIOMONITOREO GENOTÓXICO DE POBLACIONES EXPUESTAS A
SITIOS CONTAMINADOS USANDO CÉLULAS DE HUMANOS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
CLAUDIA CARRANZA RETANA**

**DIRIGIDA POR
DR. GUILLERMO CABRERA LÓPEZ**

SINODALES:

DR. GUILLERMO CABRERA LÓPEZ _____
DIRECTOR

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE _____
PROPIETARIO

M. en C. MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ MARTÍNEZ _____
PROPIETARIO

BIOL. MIGUEL ANGEL RICO RODRÍGUEZ _____
SUPLENTE

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Mutagénesis Ambiental del Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. Guillermo Cabrera López

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y a la Q.B. Ma. Guadalupe Martínez González, por su incondicional apoyo tanto en su asesoría técnica como académica, y permitirme compartir parte del trabajo y algunos datos del proyecto **"Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células uroepiteliales de individuos expuestos a mercurio en la comunidad de Plazuelas, Peñamiller, Qro"** .

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
Índice de figuras	iv
Índice de cuadros	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	4
1.1 Fuentes generadoras de contaminación	5
1.2 Efectos globales de la contaminación atmosférica	8
2. ALGUNAS SUSTANCIAS TÓXICAS Y GENOTÓXICAS	11
2.1 Óxidos de Nitrógeno.	11
2.2 Monóxido de carbono	13
2.3 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	14
2.4 Mercurio	17
3. GENOTOXICIDAD	19
3.1 Tipos de mutaciones genéticas	19
3.2 Mecanismo de acción de los agentes genotóxicos	21

4.	MICRONÚCLEO	23
4.1	Formación del micronúcleo	23
4.2	Características del micronúcleo	24
4.3	Morfología del micronúcleo	25
5.	BIOENSAYOS	26
5.1	Ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana	31
5.2	Ensayo de micronúcleos en células epiteliales orales	39
6.	IMPACTO DE LOS SITIOS PELIGROSOS EN LA SALUD HUMANA	47
6.1	Mutación en células germinales	47
6.2	Mutación en células somáticas	48
III.	HIPÓTESIS	49
IV.	OBJETIVOS	49
1.	Objetivo general	49
2.	Objetivos particulares	49
V.	METODOLOGÍA	50
1.	Individuos expuestos	50
2.	Bioensayos	52
3.	Obtención de la muestra	52
4.	Cultivo de linfocitos	53
4.1	Cosecha de linfocitos	53
4.2	Tinción de las laminillas	53
4.3	Observación al microscopio y recuento de micronúcleos	54

5. Preparación de muestras del epitelio oral	54
5.1 Tinción de Feulgen Modificada	54
5.2 Observación al microscopio y recuento de micronúcleos	55
6. Análisis estadístico	55
VI. RESULTADOS	56
VII. DISCUSIÓN	71
VIII. CONCLUSIONES	76
X. BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXO I	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Interacción entre población, ambiente y contaminación	5
2. Estructuras de algunos Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos	16
3. Formación de micronúcleos en células mononucleadas	24
4. Linfopoyesis	33
5. Micronúcleo en linfocito binucleado	36
6. Mecanismo de formación de micronúcleos en células binucleadas.	37
7. Células con micronúcleo y atipias nucleares	43
8. Postulados de procesos que dan origen a MCN y otras atipias nucleares	45
9. Frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de Individuos expuestos a contaminantes ambientales.	64
10. Frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos a contaminantes ambientales	65

11.	Efecto de la edad en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de individuos expuestos a contaminantes ambientales	66
12.	Frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de individuos expuestos agrupados por hábitos personales	66
13.	Efecto de la edad en la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos a contaminantes ambientales.	67
14.	Frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos agrupados por hábitos personales	67
15.	Frecuencia de micronúcleos y atipias nucleares en células epiteliales orales de personas expuestas a contaminantes ambientales.	58
16.	Linfocito binucleado de sangre periférica humana	69
17.	Linfocito mononucleado de sangre periférica humana con un micronúcleo.	69
18.	Células epiteliales orales normal (izquierda) y anormal "broken-egg" (derecha)	70
19.	Célula epitelial oral con anomalía nuclear (binucleada)	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Ramas industriales de mayor emisión de contaminación	6
2. Distribución de diferentes HPAs de acuerdo con su presión de vapor (kPa) y su peso molecular	15
3. Características de los grupos de individuos estudiados	50
4. Datos generales de los individuos expuestos a contaminantes	58
5. Frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana de individuos expuestos a contaminantes	60
6. Frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos a contaminantes	62
7. Análisis estadístico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana y células epiteliales orales de individuos expuestos a contaminantes, usando la prueba de " t " de Student	64

8. Análisis estadístico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana y células epiteliales orales en individuos de acuerdo a los hábitos personales como es fumar-alcohol usando la prueba de U de Mann-Whitney.

65

RESUMEN

Al paso de los años y con el avance de la tecnología se ha ido aumentando la contaminación ambiental y se han introducido en nuestro ambiente un gran número de agentes químicos sintéticos y productos industriales. Un alto porcentaje de ellos se ha detectado como genotóxicos, con la incidencia negativa que ello significa en la calidad de vida. Además, los genotóxicos representan la más importante causa de cáncer y/o envejecimiento precoz.

Se han desarrollado un gran número de bioensayos para determinar el daño al ADN o el daño cromosómico causado por agentes peligrosos, en los cuales se utilizan bacterias, mamíferos, plantas y otros sistemas. Sin embargo, estudios a largo plazo en animales y humanos son solamente los que pueden proveer evidencias conclusivas de los efectos carcinogénicos de los compuestos químicos.

Este estudio se realizó en el Estado de Querétaro y se midió el posible daño genético en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos presentes en los lugares de mayor permanencia tanto en sus actividades personales como laborales, este daño fue expresado como la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana y en células epiteliales orales.

Se estandarizó el bioensayo de micronúcleos en sangre periférica humana y se utilizó el bioensayo de células epiteliales orales que detectan el impacto de efectos biológicos en los individuos. En estudios previos realizados en el Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) de la facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro se han detectado agentes genotóxicos ambientales con la utilización de bioensayos que utilizan plantas, bacterias, insectos, animales (ratón) y humanos (células epiteliales orales y de tracto urinario). Sin embargo dentro de la batería de pruebas que evalúa genotoxicidad en el laboratorio de mutagenesis ambiental del CEACA no se contaba con la prueba que utiliza linfocitos de sangre periférica de humanos por lo que uno de los principales objetivos de éste trabajo fue el de estandarizarla.

En este proyecto se estudiaron individuos de diferente ocupación expuestos a contaminantes en los lugares de trabajo los cuales fueron: Plazuelas (comunidad rural expuesta a mercurio P), Gasolineros I (individuos expuestos a gasolina GI), Agentes de tránsito (individuos expuestos a contaminación vehicular AT), Gasolineros II (individuos expuestas a contaminación vehicular e industrial, así como a gasolina GII), Fumadores (individuos con hábitos de tabaquismo crónico F). Control negativo (comunidad rural CN). A estos individuos se les tomó muestras de sangre y de células epiteliales orales. Con la sangre se siguió la técnica descrita por Fenech, 1985 y las células epiteliales por prueba de Tolbert, 1992.

Los resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos de linfocitos de sangre periférica humana muestran que hay diferencias significativas de cada grupo expuesto comparado con el control. El análisis estadístico aplicado al grupo que presentaba los hábitos de fumar y beber alcohol (fumar-alcohol) mostró diferencias significativas cuando se comparó con el grupo control (U de Mann-Whitney, $p < 0.0002$).

El ensayo de micronúcleos de células epiteliales orales muestra que solamente hay diferencias significativas en los grupos de Plazuelas y fumadores con el grupo control ("t" de Student, $p < 0.0004$ y $p < 0.003$ respectivamente), y los grupos con hábitos de fumar y beber alcohol (fumar-alcohol) no mostraron diferencia significativa con el control. Sin embargo aunque con esta prueba algunos grupos de individuos no hayan mostrado genotoxicidad por la exposición a contaminantes, los grupos, en particular Plazuelas, gasolineros II y fumadores mostraron una frecuencia muy elevada de atipias nucleares, lo que demuestra que posiblemente los contaminantes ambientales a los que estaban expuestos ocasionen procesos citotóxicos.

I. INTRODUCCIÓN

Con el avance de la tecnología moderna y la industrialización, se han introducido en nuestro ambiente un gran número de químicos sintéticos y productos industriales. Algunos de estos químicos están catalogados como genotóxicos y/o carcinogénicos. Además de esto los químicos no sólo actúan individualmente sino que se modifican a medida que van interactuando con otros compuestos y forman mezclas sinérgicas.

Los desechos de estas industrias dañan el suelo, mantos acuíferos, aire y la cadena alimenticia humana.

En la actualidad la exposición directa o indirecta a agentes químicos que representan un riesgo a la salud se están incrementando, y paralelamente se han aumentado los estudios de mutagenicidad de esos lugares. Como ejemplo se pueden mencionar:

Los ríos que llevan desechos industriales, domésticos y agrícolas que el agricultor usa esa agua contaminada para regar sus tierras, el uso de plaguicidas y herbicidas, los contaminantes derivados de la combustión incompleta de hidrocarburos y de la incineración de basura; los procesos que se utilizan en la minería para la extracción de metales y las radiaciones procedentes de diferentes fuentes.

En el CEACA se han estudiado los contaminantes presentes en agua de beber, agua de desecho utilizada para irrigación de cultivos, rellenos sanitarios, suelos contaminados, algunos alimentos y contaminantes presentes en el aire de la ciudad de Santiago de Querétaro. Para la realización de estos estudios se han utilizado varios bioensayos que utilizan bacterias, plantas, insectos, células epiteliales orales y uroepiteliales humanas.

El principal objetivo de este estudio es el medir el posible daño genotóxico causado por contaminantes ambientales de diferentes grupos de individuos que por su lugar de mayor permanencia y su nivel ocupacional presentan riesgo a su salud, además de incrementar en el CEACA los bioensayos que emplean células humanas como sensores de daño genético.

II. ANTECEDENTES

La contaminación atmosférica, es de alguna forma, un fenómeno existente desde la aparición del hombre en la tierra, que surge por la presencia cuantitativa o cualitativa de materia o energía y que produce un desequilibrio ambiental, el cual ha ido incrementando la complejidad de la vida del hombre moderno en la sociedad actual, ocasionando transformaciones en el clima de diversas regiones de la tierra, cambios en el uso de la tierra y el agua, sequías, hambrunas, deforestaciones y modificaciones en la radiación solar que reciben los humanos, así como también sus posibles efectos en la vida vegetal, animal, y particularmente la forma en que puede afectar al hombre (Rivero y *col.*, 1993).

Los primeros problemas de contaminación de aire se hicieron notar desde el imperio Romano, y en el siglo XIV las autoridades inglesas prohibieron las fundiciones de plata y de armaduras porque se dieron cuenta que contaminaban el aire (Mueller, 1992). Pero es evidente que el problema surge en Europa con el advenimiento de la Revolución Industrial durante la segunda mitad del siglo XVIII. La civilización agrícola dio paso a las máquinas de vapor que trajo consigo las grandes concentraciones urbanas, el aumento demográfico y una acumulación de desechos que los servicios públicos fueron incapaces de eliminar y, como consecuencia, causaron daños a la salud (Cabrera y Rodríguez, 1997).

En 1895 en la ciudad de Pittsburgh se emitieron ordenanzas para reducir la cantidad de contaminantes liberados por las fundidores de acero. Pero no fue sino hasta 1911 en Boston donde a través de ordenanzas legislativas, se reconoce que la contaminación tiene efectos locales, regionales y hasta nacionales (Mueller, 1992).

Las principales causas de contaminación fueron las operaciones industriales que incluían fundidores metalúrgicas, plantas de ácido sulfúrico y fábricas de vidrio. La mayoría de las muertes ocurrieron entre personas de más edad con una historia previa de enfermedades cardíacas y pulmonares.

En 1968, gracias a la proposición de Suecia y debido al modelo existente de desarrollo acelerado, sin importar como se daba, la Asamblea General de las Naciones Unidas resolvió realizar una conferencia mundial sobre el medio ambiente humano, la cual se efectuó en Estocolmo en 1972, y por primera vez se prestó atención al hecho de que se estaban sobreexplotando los recursos naturales y a pesar de ello no se disminuía la pobreza (Cabrera y Rodríguez, 1997; Gurrión, 1999).

1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afecta a nuestro planeta, y surge cuando, por presencia cuantitativa o cualitativa de materia o energía, se produce un desequilibrio ambiental.

Durante los últimos 200 años, el hombre ha agregado al ambiente una gran cantidad de productos químicos y agentes físicos, como consecuencia de su dominio sobre los recursos naturales, especialmente sobre los energéticos (Albert, 1997).

Albert (1997) define a la contaminación ambiental como la *introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dichos sustratos, por un tiempo suficiente, y bajo condiciones tales, que esas sustancias interfieren con la salud y la comodidad de las personas, dañan los recursos naturales o alteran el equilibrio ecológico de la zona.*

Cuando se empieza a acumular materia o energía en algún lugar se genera la contaminación. La contaminación debida a causas naturales nunca va a ser tan grave como la de origen antropogénico.

Se ha observado que existe una relación muy importante entre el uso de los recursos naturales, específicamente de los elementos ambientales, con la población y los problemas de la contaminación.

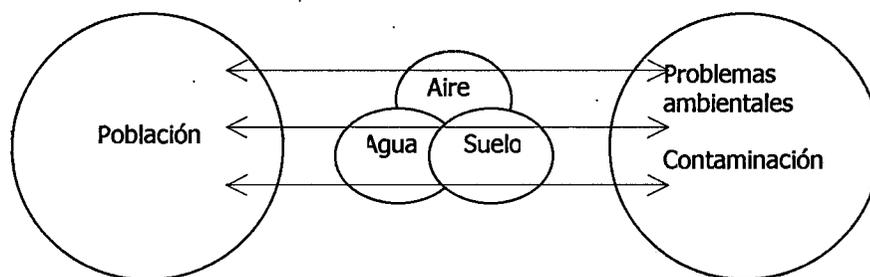


FIGURA 1. Interacción entre población, ambiental y contaminación (Enkerlin, 1997).

1.1. Fuentes generadoras de contaminación.

El ambiente contiene una gran variedad de agentes tóxicos que afectan tanto a la salud como al ecosistema. Estos agentes son compuestos químicos complejos, los cuales pueden entrar a la atmósfera por una variedad de rutas directas o indirectas. Estos pueden ser inhaladas indirectamente o ingeridas indirectamente a través de la cadena alimenticia representando un riesgo para la salud (Grant, 1998).

Las fuentes que generan contaminación y que todos estamos expuestos son las siguientes:

Fuentes industriales.

Es la fuente de contaminación más importante, la cual, dependiendo del tipo de proceso industrial, podrá emitir ciertos contaminantes, ya sea en forma de desechos sólidos, emisiones al aire y/o a la hidrosfera. Algunas de las fuentes industriales de mayor contaminación se presentan en la tabla 1.

Cuadro 1. Ramas industriales de mayor emisión de contaminación.

ORDEN	NO _x	SO	MP
1	Termoeléctrica	Cemento	Asfalto
2	Cemento	Termoeléctrica	Termoeléctrica
3	Vidriera	Papelera	Productos químicos
4	Termoeléctrica	Termoeléctrica	Cemento
5	Botellas de vidrio	Petroquímica	Papelera
6	Vidrio	Bebidas alcohólicas	Vidriera
7	Refinación de petróleo	Productos químicas	Botellas de vidrio
8	Papelera	Refinación de petróleo	Termoeléctrico
9	Vidrio	Productos de papel	Vidrio
10	Productos químicos	Vidrio	Bebidas alcohólicas

Fuente: SEDESOL/INE.

NO_x = Óxidos de Nitrógeno. SO = Óxidos de Azufre. MP = Materia Particulada

Entre los contaminantes atmosféricos más importantes que genera la industria, se encuentran los óxidos de azufre, los óxidos de nitrógeno y las partículas

suspendidas. Otros contaminantes que se generan en los procesos industriales son el bióxido y el monóxido de carbono, los cuales son producidos por la combustión total o parcial de los energéticos utilizados en estos procesos.

La Inventario Liberadora de Tóxicos de la Agencia de Protección Ambiental (1994) de los Estados Unidos de América (EUA) informó que durante 1997, 22,744 instalaciones de los EUA liberaron 2.26 billones de libras de sustancias tóxicas en el ambiente. Las descargas se distribuyeron de la siguiente manera: al aire un 68.8%, al lodo un 12.8%, subterráneo por la inyección un 15.4% y al agua de superficie 2.9%. De los tóxicos peligrosos del inventario, aproximadamente una tercera parte eran carcinógenos en roedores. En 1994, más de 177 millones de libras de tóxicos que se encuentran listados en el inventario son catalogados como carcinógenos y se liberaron en el aire y en el agua. Además, reportaron Claxton y cols., (1995) que muchos de estos químicos son liberados al ambiente y por el sólo hecho de ser genotóxicos van a producir transformación genética.

Fuentes agrícolas.

Desde tiempos remotos, los agricultores se han enfrentado a muchos problemas como plagas, insectos y demás situaciones que disminuyen el rendimiento de sus cosechas; para combatirlos han empleado plaguicidas, herbicidas y fertilizantes de origen químico, los cuales, por muchos años, han ayudado a aumentar su producción agrícola, que con el paso del tiempo han traído una serie de problemas de contaminación, persistentes tanto en los suelos, como en los alimentos y las aguas.

Los contaminantes más importantes dentro de las actividades agrícolas son de origen químico y se pueden clasificar como fertilizantes y plaguicidas, entre los cuales se tienen a los herbicidas, insecticidas y fungicidas.

Fuentes móviles.

Una fuente móvil es todo aquel vehículo automotor generador de contaminación atmosférica. El problema de las fuentes móviles representa, en la mayoría de los centros urbanos, aproximadamente 70% de la contaminación atmosférica. Entre los contaminantes más importantes que generan las fuentes móviles se encuentran los óxidos de nitrógeno y el monóxido de carbono, los cuales son producidos, principalmente, por los vehículos en mal estado (mala afinación) o por los de modelos antiguos que no cuentan con convertidor catalítico. Este dispositivo tiene la finalidad de controlar y disminuir la emisión a la atmósfera de algunos contaminantes, tales como hidrocarburos, óxidos de nitrógeno y monóxido de carbono, los cuales son producidos durante la combustión interna de los motores (Enkerlin, 1997).

Fuentes en el hogar.

Actualmente se conocen alrededor de 90 mil sustancias químicas de uso cotidiano en el hogar, las cuales contribuyen de manera importante al problema de la contaminación. Los principales contaminantes generados en el hogar son los residuos sólidos en los que se incluyen los residuos alimenticios (44.14%), el papel (18.91%), el cartón (4.91%), el pañal desechable (5.04%), la fibra vegetal (3.8%) y el plástico cuyo porcentaje en peso es poco, pero en volumen posee el valor más elevado (Vogel y Alva, 1997).

1.2 Efectos globales de la contaminación atmosférica.

Lluvia ácida.

Cuando los óxidos de azufre y de nitrógeno llegan a la atmósfera sufren una serie de reacciones químicas complejas y se transforman en ácidos sulfúrico y nítrico provocando lo que se le conoce como lluvia ácida cuyo pH es menor de 5.6, que es el pH del agua destilada en equilibrio con el bióxido de carbono y una atmósfera limpia.

El análisis químico de esta lluvia es una herramienta que puede servir como indicador del grado potencial de deterioro ambiental y los más importante que puede ser causado por: a) emisiones por el uso de combustibles fósiles, b) emisiones derivadas del uso de fertilizantes y otros productos químicos en la agricultura y c) emisiones atmosféricas de combustión de desechos industriales, urbanos y agrícolas.

Este fenómeno está asociado a dos problemas muy serios: el que implica por si solo la lluvia ácida y el segundo es el hecho de que a pesar de que los países industrializados de la Unión Europea y Estados Unidos han promulgado una serie de leyes que controlan las emisiones de dióxido de azufre y óxidos de nitrógeno, el problema de las lluvia ácida no se ha terminado. Se esperaba que al disminuir los contaminantes ácidos el problema terminaría, pero este no es el caso.

Efecto invernadero.

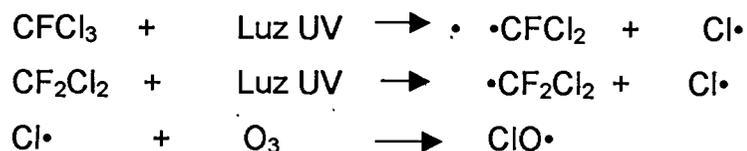
El efecto invernadero es originado por la presencia de algunos gases y partículas de la atmósfera, que permiten el paso de la luz del sol hasta la superficie del planeta, reflejándose parcialmente de la tierra a la atmósfera. Sin embargo a mayor concentración de gases, la energía reflejada por la tierra es menor, quedando atrapada por esa capa de gases y partículas. Al aumentar la concentración de gases, la temperatura de la superficie del planeta aumenta, y una cantidad de calor queda atrapada en la parte baja de la atmósfera.

Se denominan gases de invernadero todos los que pueden absorber radiaciones infrarrojas y se puede distinguir dos grupos principales: los naturales y los artificiales. Los gases naturales son: el agua, el bióxido de carbono (CO_2), el metano, los óxidos de nitrógeno (NO_x), el ozono (O_3). Los gases artificiales son de la familia de los clorofluorocarbonos (CFC).

Dstrucción de la capa de ozono.

La disminuci3n en la capa del ozono est1 relacionada con la presencia, en la atm3sfera superior, de los productos conocidos como clorofluorocarbonos (CFC), los cuales, al descomponerse, generan radicales de cloro que reaccionan con el ozono y lo destruyen.

Los CFC m1s importantes son el triclorofluorometano (CFCI3), o CFC-11, y el diclorodifluorometano (CF2Cl2) o CFC-1. Estos compuestos son muy persistentes en la troposfera, tienen una vida media de entre 50 y 800 a1os, debido a su baja reactividad, alta volatilidad y baja solubilidad en agua, por lo que no son eliminados de la atm3sfera por la lluvia, ni por reacci3n con otros compuestos. Estas caracter1sticas hacen que estas sustancias puedan difundirse hasta la estratosfera, en donde la energ1a de las radiaciones de alta frecuencia causa que se formen radicales libres de cloro (Cl•), los que reaccionan con el ozono destruy3ndolo.



Esta reacci3n se realiza en cadena, por lo que se calcula que cada 1tomo de cloro puede causar la destrucci3n de no menos de 100 mil mol3culas de ozono (Flores, 1997).

2. ALGUNAS SUSTANCIAS TÓXICAS Y GENOTÓXICAS

Se sabe que la atmósfera contiene una gama de sustancias genotóxicas incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y alquenos de bajo peso molecular (etileno y butadieno) que son metabolizados por epóxidos; aminas aromáticas y nitroaromáticas; agentes alquilantes de bajo peso molecular; y óxidos de nitrógeno (NO_x) que puede generar nitrosaminas genotóxicas por la reacción con aminas.

A continuación se mencionarán los compuestos químicos más relacionados con este trabajo:

2.1 Óxidos de Nitrógeno.

Propiedades.

El óxido nítrico es un gas inodoro e incoloro, ligeramente hidrosoluble. Si bien el punto de ebullición del dióxido de nitrógeno es 21.2°C , solo existe en forma gaseosa a las temperaturas normales del aire debido a su baja presión parcial.

El óxido nítrico es relativamente reactivo y se oxida fácilmente en la atmósfera, pasando a dióxido de nitrógeno. La conversión se realiza mediante varias reacciones que dependen de las concentraciones del óxido nítrico (OMS4, 1979).

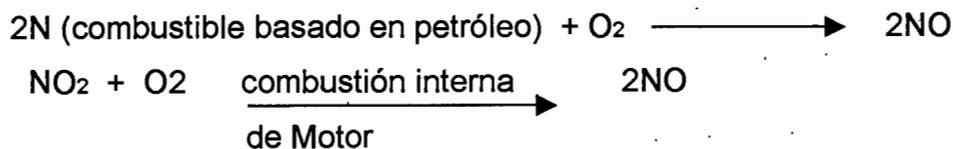
Fuentes.

El óxido y el dióxido de nitrógeno se produce naturalmente por acción bacteriana y volcánica y por los rayos en cantidades muy superiores a las generadas por la actividad humana. Las fuentes xenobióticas es la utilización de combustibles fósiles en fuentes estacionarias (calefacción y electro generación) y automotores

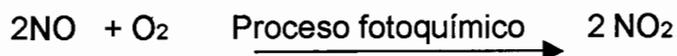
(motores de combustión interna). Otras contribuciones a la atmósfera provienen de procesos industriales específicos sin combustión, como la fabricación de ácido nítrico y explosivos. Entre las fuentes en el hogar se encuentra el hábito de fumar, los artefactos domésticos alimentados por gas y los calentadores de petróleo (OMS4, 1979).

Formación.

Los dos óxidos de nitrógeno más comunes son el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO₂), designado colectivamente como NO_x. Se producen por combustión a altas temperaturas el oxígeno y el nitrógeno presentes en el aire; o bien, al oxidarse nitrógeno presente en los combustibles, mismos que pueden contenerlo en elevadas proporciones (por ejemplo, el carbón puede contener un 2%), o en proporciones insignificantes (por ejemplo el gas natural) (Vogel y Alva, 1997). El óxido nítrico se produce como proceso de combustión del nitrógeno endógeno orgánicamente atado a los combustibles basado en petróleo (particularmente carbón, petróleo combustible pesado, y el petróleo silicoclástico) y de nitrógeno atmosférico por la acción de la combustión interna del motor como se muestra en las siguientes reacciones:



Bajo las condiciones de smog fotoquímico el óxido nítrico se convierte al dióxido de nitrógeno por la reacción siguiente:



Esta conversión consiste de reacciones en cadena complejas que involucran energía y especies intermedias reactivas inestables. Las condiciones requeridas son el aire, humedad baja, luz del sol intensa, y la presencia de hidrocarburos (los de descargas de automóvil). De los óxidos de nitrógeno existentes el NO₂ es el más tóxico.

Efectos del Óxido Nítrico (NO₂).

La inhalación de NO₂ ocasiona irritación de las partes íntimas de los pulmones resultando edema pulmonar y bronquiolitis fibrosa fatal. La inhalación por períodos muy breves de tiempo de aire que contiene 200-700 ppm de NO₂ puede ser mortal. La acción bioquímica de NO₂ incluye interrupción de algunos sistemas de enzimas, tal como deshidrogenasa láctica, también probablemente actúa como un agente oxidante, aunque más débil que el ozono. Incluye la formación de radicales libres, particularmente el radical hidroxilo OH[·].

Efecto del Óxido Nitroso (NO).

Se usa como gas oxidante y en la cirugía dental como anestésico general, es depresor del sistema nervioso central y puede actuar como un asfixiante.

2.2 Monóxido de carbono.

Propiedades.

El monóxido de carbono (CO) es un gas incoloro, inodoro e insípido, ligeramente menos denso que el aire. Es un producto de la combustión incompleta de combustibles que contienen carbono, y se presenta también en algunos procesos industriales y biológicos. Su importancia para la salud, como contaminante atmosférico, reside fundamentalmente en que establece un fuerte enlace de coordinación con el átomo de hierro del complejo protoheme de la hemoglobina y forma carboxihemoglobina (HbCO), sustancia que disminuye la capacidad de la sangre de transportar oxígeno. La presencia de carboxihemoglobina en la sangre también altera la disociación de la oxihemoglobina, de tal modo que resulta aún más disminuida la provisión de oxígeno a los tejidos.

Fuentes.

En la actualidad, no se conoce bien qué importancia tienen las fuentes naturales de

monóxido de carbono para el hombre. Se estima que las emisiones de CO proveniente de fuentes artificiales oscilan entre 350 y 600 millones de toneladas al año. Sin duda la fuente más importante en el nivel de inhalación es el escape de vehículos con motores de gasolina. El índice de emisión depende del tipo de vehículos, su velocidad y modo de operación. Entre otras fuentes se incluyen los generadores de calor y de energía, algunos procesos industriales, como la carbonización de combustibles, y la incineración de desechos. El funcionamiento defectuoso de cocinas y aparatos de calefacción domésticos puede convertirse en fuentes importantes a menudo no detectadas (OMS13, 1983).

Efectos.

Impide la adecuada oxigenación de la sangre, debido a que la hemoglobina tiene una afinidad 20 veces mayor con el CO₂ que con el oxígeno. Es por esto que, a concentraciones superiores de 300 ppm, el CO puede causar la muerte por asfixia (Vogel y Alba, 1997).

Carcinogenicidad y mutagenicidad.

No se tienen pruebas de carcinogenicidad y mutagenicidad relacionada con la exposición al monóxido de carbono (OMS13, 1983).

2.3 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs).

Propiedades.

Pueden encontrarse en fase de vapor o gaseosa y/o en fase sólida o particulada, lo que depende, principalmente, de su peso molecular y su presión de vapor que son característicos de cada tipo de HPAs y de la temperatura ambiente. Los HPAs son insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos como tolueno, acetona, ciclohexano, metanol o tetrahidrofurano. Son liposolubles, por los que se absorben fácilmente por la piel y penetran al organismo, sobre todo, en fase particulada. La

vía inhalatoria también tiene un papel muy importante en la absorción ya que hay estudios que demuestran que el benzo(a)pireno B(a)P se adhiere a las partículas menores de $3\mu\text{m}$. Incluso investigaciones más recientes indican que, en las zonas urbanas, el 75% del B(a)P de los aerosoles se encuentran en partículas menores de una micra, con un diámetro aerodinámico menor a $0.6\mu\text{m}$. Por el tamaño de las partículas se facilita su absorción pulmonar. Algunas de las propiedades fisicoquímicas de los HPAs se observan en la cuadro 2.

CUADRO 2. Distribución de diferentes HPAs de acuerdo con su presión de vapor (kPa) a 25°C y su peso molecular.

FASE	COMPUESTO	PRESIÓN DE VAPOR kPA $_{25^{\circ}\text{C}}$	PM
Gaseosa	Naftaleno	10-1 a 10-2	128
	Fluoreno	10-3 a 10-4	166.2
	Fenantreno	10-3 a 10-5	178.2
	Antraceno	10-4 a 10-5	178.2
Gaseosa y	Pireno	10-5 a 10-7	202.3
Sólida	Benzo(a)antraceno	10-7 a 10-8	228.3
	Benzo(a)pireno	10-9 a 10-10	252.3
Sólido	Benzo(a)pireno	10-9 a 10-10	252.3 (Partículas)
	Benzo(g,h,i)pirileno	10-10 a 10-11	276.3

PM: peso molecular

Fuente: Modificado de Junge (1997).

Fuentes.

Es un grupo complejo de compuestos químicos, se forman durante la combustión incompleta del material orgánico y son contaminantes que se encuentran prácticamente en todas partes. Las fuentes generadoras de HPAs son: plantas de poder, sistemas de calentamiento doméstico e industrial, quema de basura, máquinas de diesel y gasolina, y humo de cigarro entre otras. Muchos de estos

compuestos se les ha identificado como químicos inductores de cáncer en animales y/o humanos (Karahalil y *col.*, 1999).

Algunos de los componentes de los PAHs son: naftaleno, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, ántraceno, fluorantraceno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)pirileno, benzo(a)antraceno, metilclorantreno, benzo(a)pireno y dibenzo(h)acridina entre otros (Figura 2). De los cuales se ha comprobado que los últimos 4 son altamente carcinógenos.

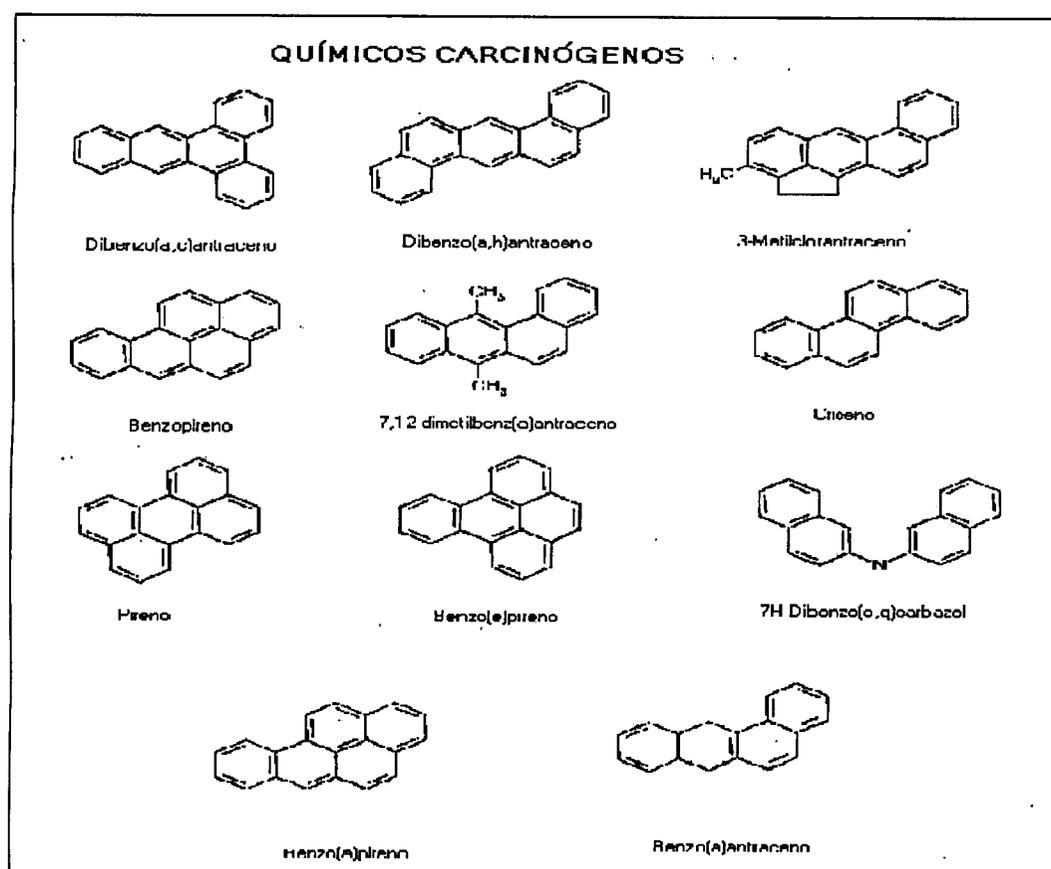


FIGURA 2. Estructuras de algunos Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

Carcinogenicidad y mutagenicidad

La referencia histórica más antigua sobre estos compuestos se remonta a 1775, con Percival Pott, quien fue el primero en asociar la exposición al hollín de las chimeneas con el cáncer del escrotó de los deshollinadores (Mercado, 1997). Se ha comprobado que los HPAs son carcinogénicos sólo después de su transformación bioquímica. Durante el proceso de desintoxicación de las sustancias lipofílicas, los organismos se biotransforman para dar compuestos hidrosolubles y polares cuya excreción urinaria es más fácil pero, al mismo tiempo, producen compuestos que pueden actuar como iniciadores de efectos genotóxicos, pues pueden alterar el DNA. El metabolito mejor conocido es el 7,8 diol, 9-10 epóxido de benzo(a)pireno que reacciona, por ejemplo con el grupo 2-amino de la guanina, presente en los ácidos nucleicos, dando origen a aductos que, en la actualidad, se consideran como iniciadores de los procesos de mutagénesis. El sistema enzimático de las mono-oxidasas intervine en el proceso de activación metabólica para formar estos metabolitos electrofílicos, junto con el sistema de citocromos P-450 (Mercado, 1997).

2.4 Mercurio

Propiedades.

El mercurio puede existir en una gran variedad de estados físicos y químico. Las distintas formas de éste elemento tiene sus propiedades tóxicas intrínsecas y diferentes aplicaciones en la industria, agricultura y medicina. En su forma metálica es líquido a temperatura ambiente. Su presión de vapor es suficientemente elevada para dar concentraciones nocivas de vapor a las temperaturas que normalmente se observan dentro y fuera de los edificios en la mayoría de las condiciones climáticas. El vapor de mercurio elemental se considera en general insoluble. En presencia de oxígeno, el mercurio metálico se oxida rápidamente, adquiere la forma iónica mercurio (II).

El cloruro de mercurio (II) es un compuesto altamente reactivo, desnaturaliza fácilmente las proteínas. Es soluble en agua y, en solución, forma cuatro complejos diferentes de cloruro, HgCl^+ , HgCl_2 , HgCl_3^- y HgCl_4^{2-} (OMS1, 1978).

Fuentes.

La fuente más significativa probablemente sea el empleo de combustibles fósiles. Heindryckx (1974) calcularon las siguientes cifras sobre la base de informes publicados en 1971 y 1972: combustión de carbón y lignita, 3 000 toneladas por año; refinado y combustión de petróleo y gas natural, 400 toneladas por año; producción de acero, cemento y fosfato, 500 toneladas por año. Otra fuente de contaminación es la extracción de metales utilizando menas de sulfuro, la fabricación de cemento y fosfato.

Efectos

Los vapores de mercurio entran por vía respiratoria, se absorben por las membranas alveolares y pasan directamente al torrente sanguíneo. En forma de metilmercurio también se puede absorber al consumir alimentos contaminados, como ocurrió con peces en Minamata, Japón.

Los principales daños causados por el metal se presentan en el sistema nervioso central, y se manifiestan con temblores, alteraciones de la sensibilidad, pérdida de la memoria, hiperexcitabilidad, eretismo y disminución de los reflejos. Puede haber consecuencias a largo plazo, con daño renal, bronquitis, neumonitis intersticial, inflamación pulmonar, sabor metálico, aumento en la salivación, inflamación de la mucosa bucal y de las encías, tos, dolores de pecho, diarrea, vómito y hemorragia.

3. GENOTOXICIDAD.

El material genético de la especie humana y de todas las otras especies es nuestra más preciosa herencia. La gran responsabilidad de salvaguardar este legado se confía a cada generación. Esta responsabilidad es muy difícil debido al incremento y diversidad de las sustancias químicas hechas por el hombre que están entrando a nuestro medio ambiente, a través del aire que respiramos de los alimentos o de agua que ingerimos o de algunos agentes con los que estamos en contacto.

Desde hace algunos años existe preocupación de que las sustancias tóxicas sean factores que contribuyen a que se den varias clases de enfermedades muy severas como las genéticas, incluyendo el cáncer, las congénitas, ataques al corazón, paros cardiacos y envejecimiento prematuro.

La genotoxicidad puede entenderse como el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula (Clayson y Grant, 1992).

Su enfoque está sobre fallas heredables en células somáticas (cuerpo) y células germinales (reproductivas). Los cambios en la función y la estructura del gen en células somáticas es el mecanismo básico para la producción de cáncer (oncogenesis). Cambios en la estructura y función de células germinales pueden resultar en: infertilidad, aborto espontáneo, defectos en el nacimiento y cambios heredables en la estructura genética (Craigmill, 1982).

3.1 Tipos de mutaciones genéticas

Las mutaciones genéticas pueden clasificarse según el tipo de cambio que ocurre al material genético y pueden ser:

- mutación de genes
- aberraciones cromosómicas
- mutaciones genómicas

Mutación de genes

El primer tipo de genotoxicidad es la mutación de genes y ocurren cuando hay un cambio en la secuencia del ADN de un gene. El cambio más sencillo sería la sustitución de un nucleótido sencillo, lo que se conoce como mutación de punto. Hay dos términos para indicar estas mutaciones, si una purina se cambia por otra purina o una pirimidina se cambia por otra pirimidina ocurre una transición o si una purina se cambia por una pirimidina ocurre una transversión.

Un segundo tipo de cambio que ocurre es la inserción o la eliminación de uno o más pares de bases, lo que ocasiona un corrimiento total en todos los nucleótidos presentes en la cadena.

Aberraciones cromosómicas.

Es una mutación que involucra desde más de un par de bases hasta el genoma completo de un organismo. Dentro de esta tenemos adición y eliminación de pares de bases, inversiones y translocaciones. Esta alteración puede ser detectada con la ayuda de un microscopio examinando los cromosomas en la etapa de metafase y se pueden observar rompimientos cromatídicos y cromosómicos, fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos y cromosomas en forma de anillo.

Mutaciones genómicas

Afectan al número total de cromosomas o sea al genoma y originan un número de series haploides (= juegos cromosómicos) distinto del normal (triploide, tetraploide, etc.) o aumento o disminución de algún cromosoma.

Pueden ser:

- **Euploidía:** Afectan al conjunto del genomio, bien aumentando el número de juegos cromosómicos (poliploidia) o bien reduciéndolo a una sola serie (haploidía).

- **Aneuploidía:** Afectan al número de cromosomas individualmente (por defecto o por exceso). Se debe generalmente a que durante la meiosis en alguna de las parejas de cromosomas homologas no se separan los cromosomas y se incorporan ambos a un mismo gameto. Cuando este gameto fecunde a otro se originará un cromosoma triplicado (trisomía); igualmente también habrá gametos que tendrán un cromosoma menos y, por ello, cuando fecunden a otro normal, el individuo tendrá un cromosoma menos (monosómicos).

3.2 Mecanismo de acción de los agentes genotóxicos.

El estudio de la interacción directa o indirecta entre los agentes fisicoquímicos y el ADN, así como la búsqueda de los sistemas de ensayo donde medir la capacidad de las distintas sustancias para producir mutaciones, polarizan hoy en día la atención de los investigadores (León y *col.*, 1988).

Los esfuerzos se han orientado principalmente al estudio de compuestos químicos, ya que se han identificado más de cuatro millones de éstos en la actualidad y cerca de 60 000 productos sintéticos se encuentran en el comercio. De estos últimos, aproximadamente 25 000 son de uso común y se calcula que a ellos se suman unos 1 000 nuevos compuestos que se producen año con año (Vega, 1985; Ames y *col.*, 1987).

Se sabe que algunos compuestos químicos pueden participar en el proceso de carcinogénesis debido a su capacidad mutagénica, es decir, existe la posibilidad de que un compuesto mutagénico sea también carcinogénico. Aun cuando un compuesto no sea mutagénico por sí mismo, al asociarse a otros compuestos o

bien al sufrir transformación dentro del organismo, se puede convertir en mutagénico por acción enzimática.

El número de sustancias que han demostrado su capacidad mutagénica es elevado, destacando los hidrocarburos policíclicos aromáticos, las aminas aromáticas y los compuestos alquilantes. Muchas de estas moléculas no son mutagénicas por si mismas, sino que adquieren esta capacidad debido a la activación metabólica por distintas enzimas del hígado que promueven epoxidaciones, hidroxilaciones o desaminaciones (León y col., 1988).

En numerosos estudios se ha corroborado que algunos agentes químicos inducen directamente modificaciones en el ADN, en tanto que otros requieren de metabolismo realizado por la fracción microsómica S9 de las células hepáticas de mamíferos para activarse y así provocar un daño. Durante décadas pasó inadvertido que los vegetales poseen dicho metabolismo o sistemas enzimáticos, sin embargo, recientemente se ha demostrado la activación de compuestos químicos y plaguicidas por las plantas, los cuales evidencian su actividad mutagénica en diverso organismos que se consideran sensores o indicadores del daño genético. A los agentes químicos que por sí mismos no son mutagénicos y que requieren de la activación metabólica para ejercer dicho efecto se les denomina "Premutágenos" o "mutágenos indirectos" (Calderón y Espinosa, 1998).

Se sabe que aunque las enzimas microsomales del hígado metabolizan una gran variedad de sustancias químicas extrañas, es claro que algunos carcinógenos químicos son resistentes a la oxidación por dichas enzimas y pueden ser metabolizados de manera diferente en el hígado y en el tejido blanco. Se tienen evidencias experimentales de que los citocromos P450 y P448 están íntimamente relacionados en la desactivación y detoxificación de una gran variedad de sustancias. Sin embargo, también pueden activar algunas sustancias para originar carcinógenos electrofílicos (Lijinsky, 1989).

4. MICRONÚCLEO

Rieger y *col.*, (1968) en su 'diccionario de Genética y Citogenética', definen un micronúcleo como un núcleo separado y adicional al núcleo principal de la célula que se produce durante la anafase de la mitosis o meiosis por un retraso en los cromosomas o fragmentos cromosómicos derivados desde un cambio espontáneo, experimentalmente inducidos, o cambios cromosómicos estructurales (Evans, 1997).

4.1 Formación del micronúcleo

El micronúcleo es formado a partir de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos que quedan rezagados durante la anafase en la división celular. Por lo tanto, su presencia es un reflejo de rompimiento cromosómico durante la mitosis (Rooney y Czepulkowski, 1992). Los micronúcleos se forman en el citoplasma mediante los sucesos siguientes (figura 3):

- i) en anafase, el micronúcleo proviene de fragmentos cromosomales o cromosomas acéntricos que no son incorporados durante la mitosis en los núcleos de las células hijas por que carecen de un centrómero.
- ii) Los elementos retrasados pueden inducirse en los núcleos de las células hijas, pero el huso no los guía y hay desde uno o varios núcleos secundarios que son mucho más pequeños que el núcleo principal (1/5 a 1/20), y se llaman por lo tanto micronúcleos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

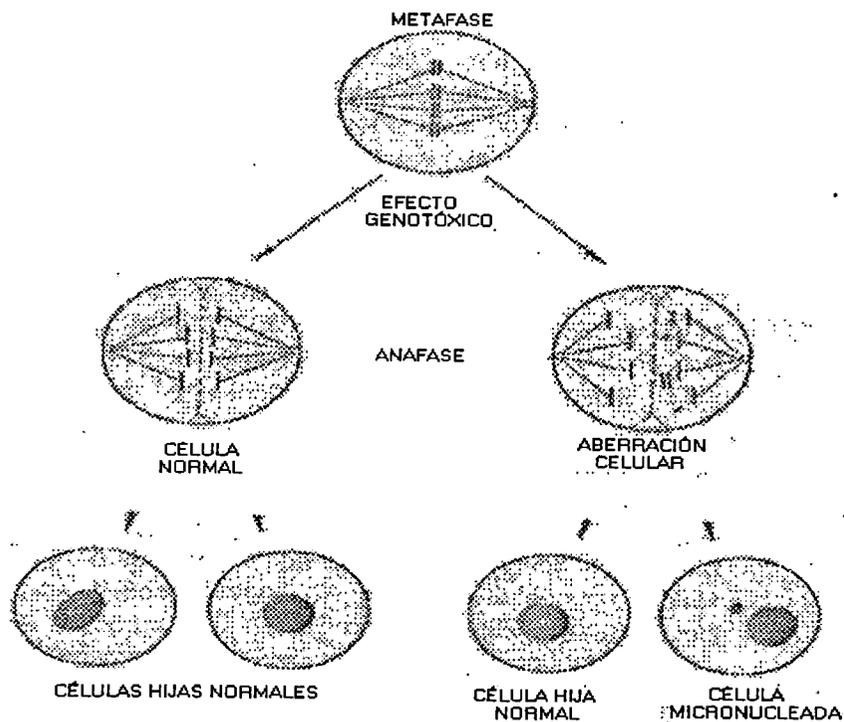


FIGURA 3. Formación de micronúcleos en células mononucleadas (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

4.2 Características del micronúcleo

El micronúcleo (MN) es un fragmento cromosómico y resulta, p. ej., desde (A) fractura directa del ADN; (B) repetición sobre una plantilla dañada de ADN; e (C) inhibición de síntesis de ADN. El micronúcleo que alberga la totalidad de cromosomas se forma primariamente desde el fracaso del huso mitótico, del cinetocoro, o por el daño a la subestructura cromosomal, alteraciones en la fisiología celular, e interrupción mecánica. Así, una frecuencia aumentada de células micronucleadas son biomarcadores de efectos genotóxicos que pueden reflejar la exposición a agentes clastogénicos (rotura del cromosoma) Albertini y col., (2000).

4.3 Morfología del micronúcleo

La información que se puede tener con respecto a la morfología de los MN es escasa cuando se analiza en microscopio óptico convencional, ya que se observan como partículas citoplasmáticas con tinción similar a la nuclear. Son de tamaños variables (hasta de un tercio del núcleo principal) dependiendo del tipo celular que se está analizando y son usualmente redondos o levemente ovales. La microscopía electrónica es mucho más informativa en cuanto a su forma. Muchos micronúcleos son tan pequeños que no se pueden detectar con el aumento de microscopio óptico (Stich y *col.*, 1982). Tienen la típica envoltura nuclear que consiste en una doble membrana, se puede observar la laminilla y los poros nucleares (Mueller y Streffer, 1994). Puede sintetizar ARN, ARNm y ARNr si el fragmento cromosómico contiene región organizadora nuclear. Existe controversia acerca de la sincronía y velocidad de la síntesis de ADN en el MN con respecto a la del núcleo principal. Algunos trabajos muestran que el MN presenta un retraso en su progresión a través del ciclo celular (Kato y Sandberg, 1968; Obe y Beck, 1975), mientras que Das (1962), Kramer y *col.*, (1990) demostraron una alta sincronía entre las dos estructuras.

Los primeros micronúcleos fueron observados hace más de un siglo en el citoplasma de eritrocitos por Neumann en 1869, como pequeñas estructuras redondeadas que se tiñen como el núcleo de una célula, éstas estructuras también se llamaron "fragmentos nucleares" o "corpusculos intraglobulares".

5. BIOENSAYOS EMPLEADOS PARA EVALUAR SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD GENOTÓXICA.

Desde los primeros años de la década de los setenta se han desarrollado y aplicado muchos bioensayos para probar la genotoxicidad de los agentes químicos. La mayoría de estos bioensayos no son rápidos ni fáciles y muchas veces es costoso desarrollarlos (Ma, 1986).

Las pruebas de genotoxicidad tienen por objetivos demostrar cualitativamente la presencia o ausencia de capacidad mutagénica o carcinogénica de agentes químicos y físicos, servir de guía para la evaluación y cuantificación de riesgo genético humano por la exposición a tales agentes, así como evaluar los efectos reproductivos y teratogénicos (Vega, 1985a).

Existen numerosas pruebas para evaluar la capacidad genotóxica de los agentes químicos. Tales pruebas permiten determinar distintos tipos de alteraciones genéticas, tanto en células somáticas como reproductoras, *in vivo* e *in vitro* (Vega 1985a).

Algunas de las pruebas han sido más utilizadas que otras, constituyéndose en bases de datos para calcular su grado de sensibilidad y especificidad. Entendiéndose por sensibilidad la proporción de agentes genotóxicos conocidos que den resultados positivos en el sistema de prueba; y por especificidad, la proporción de compuestos no genotóxicos que dan resultados negativos en el sistema de prueba.

Existen dos tipos de pruebas de genotoxicidad. Las pruebas de larga duración, que apuntan a evaluar la carcinogenicidad y teratogenicidad, en periodos que van desde meses hasta años; se efectúan fundamentalmente *in vivo*, en mamíferos.

Las pruebas de corta duración son diseñadas para demostrar, en un término de días hasta meses, según la prueba, la capacidad mutagénica de la sustancia estudiada (Vega, 1985; Ma., 1986).

A continuación se resumen las características más relevantes de las pruebas más usuales en la identificación de mutágenos.

ADN

Sólo las pruebas biológicas pueden corroborar si una alteración particular del ADN se traduce en una mutación, sin embargo, los estudios de las modificaciones producidas directamente en esa molécula, permiten estimar, a corto plazo, lo que puede ocurrir si un compuesto dado tiene acceso a ella *in vivo* e inferir el mecanismo de acción posible.

Entre las técnicas más empleadas para detectar cambios en el ADN se encuentran:

- a) Rompimiento de cadenas sencillas
- b) Entrecruzamiento inter o intra cadenas
- c) Intercalación de colorantes
- d) Alquilación de bases

La duración de esta prueba es de 2 a 3 días. Los factores limitantes son el costo del equipo y uso de algunas técnicas relativamente difíciles.

Pruebas en microorganismos.

El gran tamaño y corto tiempo de generación de las poblaciones sobre las que se realiza el estudio, hace de estas pruebas un elemento útil para el examen rápido y preciso de un número elevado de compuestos.

- Virus

Mediante su empleo se valora, fundamentalmente, la capacidad de las sustancias para inducir mutaciones génicas o para activar la liberación y replicación de los

virus (profagos) que se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano y que producen la muerte de la bacteria (lisogenia). La alteración identificada es mutaciones génicas e inducción de profagos. La duración de la prueba es de 2 a 3 días.

- Bacterias

La inducción de mutaciones génicas puede determinarse en varias especies bacterianas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*). Una de las ventajas de algunas de ellas es que se proveen indicios de los mecanismos de producción de las mutaciones, además de la información sobre la capacidad mutagénica de los compuestos. La duración de a prueba es de 3 a 5 días.

- Hongos

Estos se asemejan más a los mamíferos que los anteriores, ya que sus células poseen un núcleo, los cromosomas contienen ADN asociado a nucleoproteínas y los ciclos de división incluyen procesos meióticos y mitóticos. Entre los más usados en el laboratorio se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niduans* y *Neurospora crassa*. Las pruebas más importantes comprenden mutaciones génicas, recombinación mitótica, conversión génica y segregación cromosómica defectuosa. La duración de la prueba es de 1 a 3 semanas.

- Estrategias para determinar la actividad genética de los metabolitos

Los microorganismos no poseen todos los grupos enzimáticos responsables de la activación o detoxificación de las drogas existentes en los mamíferos y en el hombre, por lo que se han desarrollado diversas estrategias para usarlas en la determinación del efecto de los metabolitos. Entre ellas podemos citar:

- a) El empleo de homogeneizados celulares que contienen las enzimas microsomales provenientes, fundamentalmente, del hígado de roedores (rata, hamster), que ejercen su acción *in vitro* sobre los compuestos.

Las células de mamíferos pueden convertir algunos compuestos no mutagénicos a compuestos altamente mutagénicos. Tales premutágenos pueden no ser detectados mediante pruebas que utilicen microorganismos, a menos que el compuesto se ponga en contacto precisamente con células de mamíferos. El ensayo microsomal de mutagenicidad es una técnica *in vitro* que permite a los tejidos activar premutágenos en presencia del organismo de prueba, en el cual las mutaciones inducidas se detectan fácilmente (Frantz y Malling, 1975; OPS, 1980).

- b) La utilización de fluidos corporales. Como orina y sangre, de individuos (animales de laboratorio o humanos) expuestos *in vivo* a los agentes químicos.
- c) El ensayo vía el hospedero, en el que los microorganismos se introducen en un ratón (en el peritoneo o en la sangre), al que se administra la sustancia en estudio.

Cultivos de células de mamíferos.

Se usan diferentes líneas celulares (humanos, de hamster y de ratón) que, al igual que los microorganismos, permiten obtener resultados en un tiempo relativamente corto (2 a 5 semanas), en experimentos controlados, y usar un gran número de células. Asimismo, constituyen un material adecuado para el estudio de las mutaciones génicas y de aberraciones cromosómicas, numéricas y estructurales.

Pruebas en plantas.

Estas son útiles como dosímetros biológicos en el estudio del efecto de contaminantes ambientales, plaguicidas, herbicidas, fertilizantes químicos y cualquier sustancia distribuida en forma natural en el medio ambiente, lo cual es difícil de hacer con otros sistemas de prueba. Además, no dejan de ser adecuadas para utilizarse en el laboratorio, debido a su bajo costo de mantenimiento y a los requisitos mínimos de cuidado en experimentos estrictamente controlados.

Existen indicios de que las plantas metabolizan las sustancias en forma diferente de como lo hacen los mamíferos. Es probable, entonces, que algunos compuestos que no tienen efecto directamente sobre los mamíferos, pueden verse convertidos en metabolitos activos por la acción de las plantas y constituir así un riesgo para los consumidores.

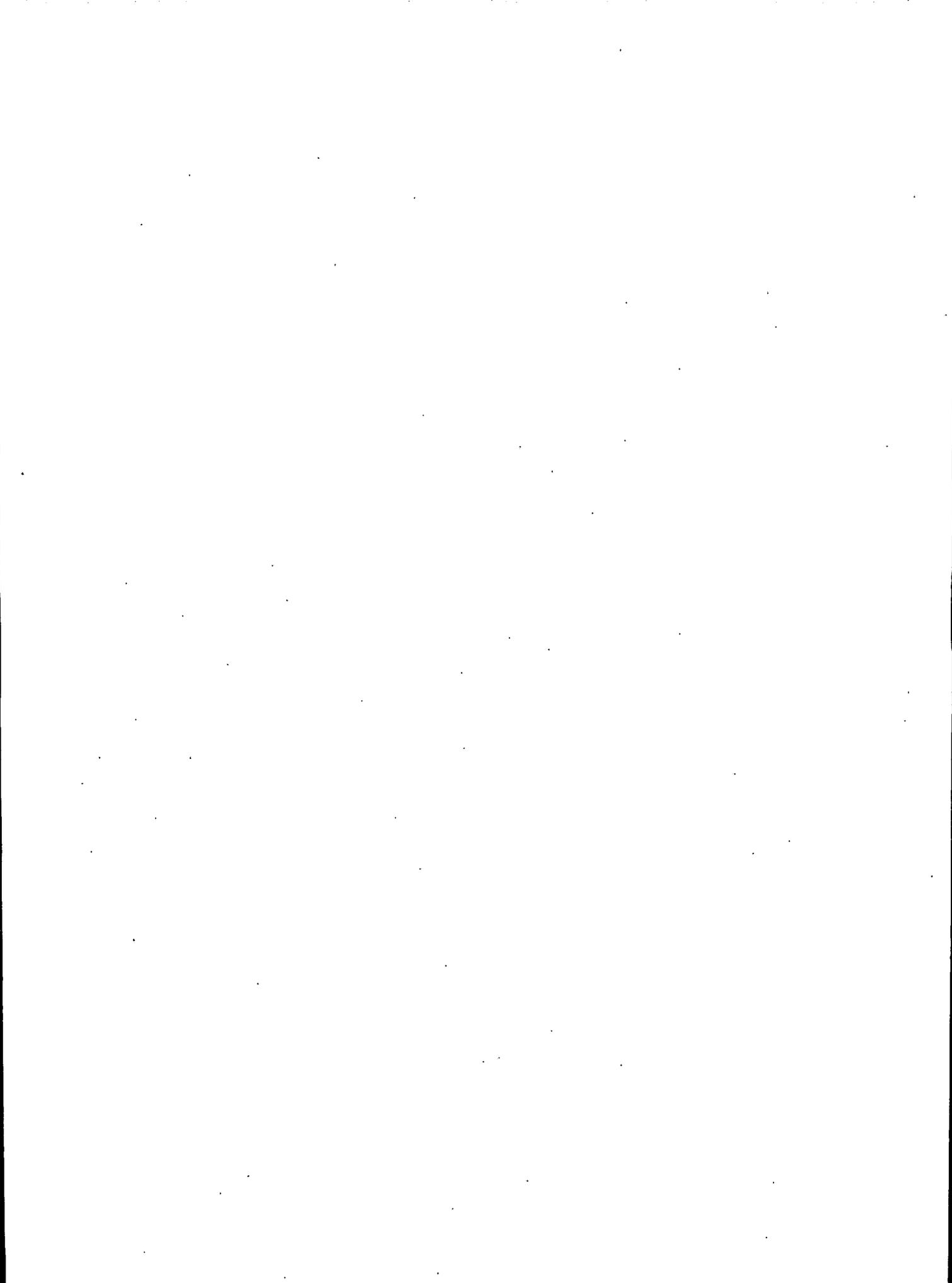
Las plantas más usadas son la " hierba del pollo" (*Tradescantia paludosa*), la cebolla común (*Allium cepa*) y el haba (*Vicia faba*), en las que se pueden valorar mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas.

Insectos

Las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) es el insecto más utilizado por el amplio conocimiento que se tiene de su generación y por ser un organismo que se reproduce en un lapso corto, generando grandes poblaciones que requieren de un mantenimiento mínimo. Por todo ello, éste es el sistema animal más rápido para detectar mutaciones génicas (de tipo recesivo ligadas al sexo) y cromosómicas (segregación defectuosa y translocaciones) en células germinales. Tiene, además la capacidad de metabolizar los compuestos en forma muy similar a los mamíferos y es susceptible de usarse como dosímetro biológico al igual que las plantas.

Mamíferos no humanos.

El ratón es el mamífero más estudiado desde el punto de vista genético, lo que favorece su empleo en la identificación de mutágenos. Se utiliza para valorar mutaciones génicas (en un sitio o locus específico en el cromosoma) y aberraciones cromosómicas somáticas y germinales (con efectos dominantes letales o del tipo de translocaciones hereditarias). Estas pruebas, a diferencia de las citadas anteriormente, consumen más tiempo en su realización y análisis, y por lo tanto, su costo es mayor. Una técnica más reciente se basa en el análisis de los cambios morfológicos de los espermatozoides, ya que se ha señalado que estos pueden manifestarse de algunas alteraciones genéticas.



Humanos.

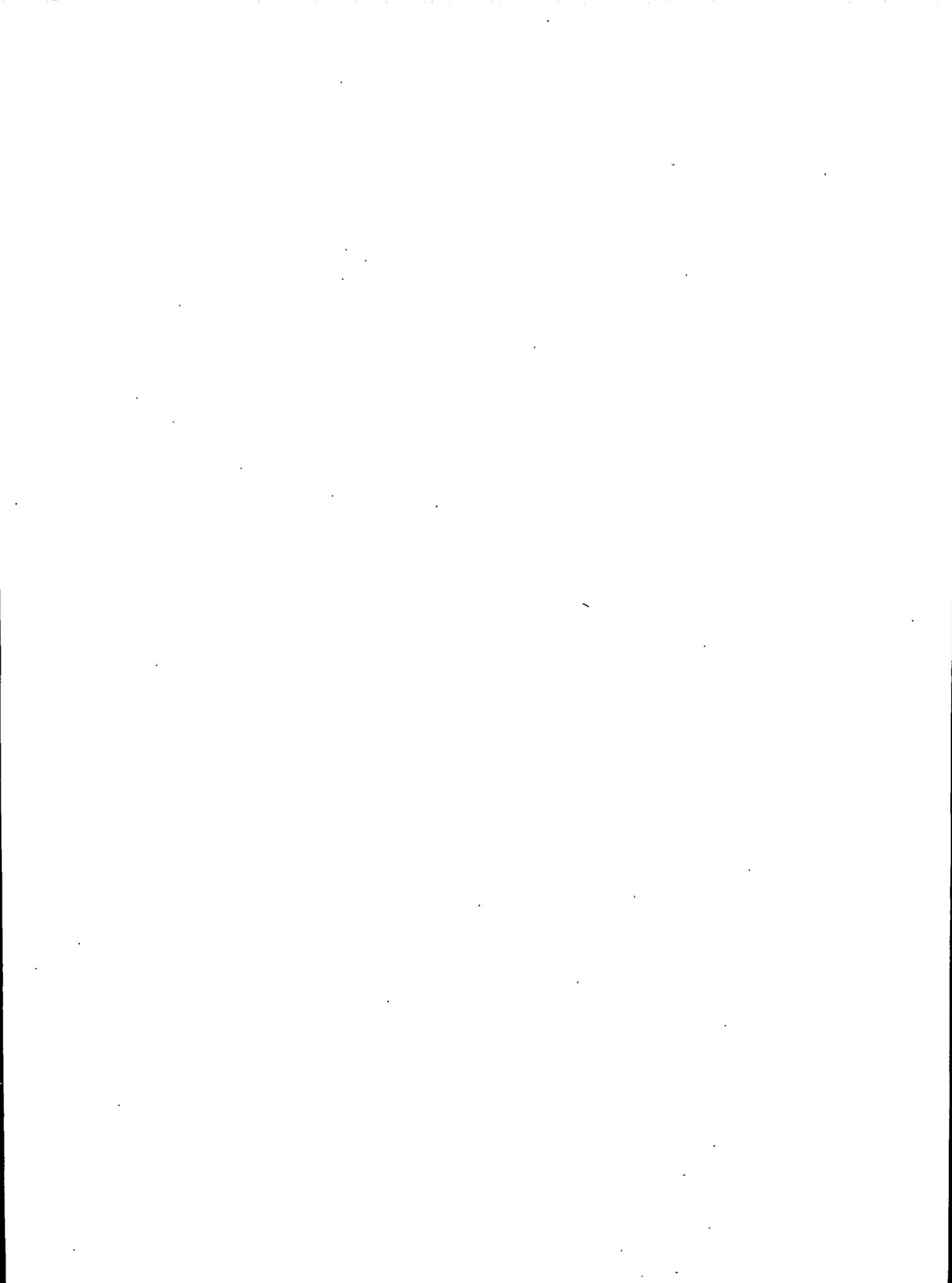
Estos estudios se realizan, en general, en individuos expuestos en circunstancias médicas, ambientales, accidentales y excepcionalmente en condiciones experimentales. Sólo se cuenta en la actualidad con pruebas para identificar, en forma directa, lesiones cromosómicas numéricas y estructurales en células de la médula ósea o linfocitos sanguíneos y la presencia de más de un cromosoma Y en los espermatozoides. El análisis cromosómico de las células germinales en meiosis, aun cuando técnicamente es posible realizar, rara vez se hace debido principalmente a la dificultad para obtener muestras del tejido de la gónada. Los mismos que en el caso del ratón, la determinación de anomalías morfológicas en los espermatozoides también pueden servir como un indicador de alteraciones reproductivas (Cortinas y *col.*, 1980)

5.1 Ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana

Por años, después de su descubrimiento, el linfocito fue considerado un componente insignificante de la sangre y la linfa. Desde 1960 los extraordinarios adelantos de la inmunología han entronizado al linfocito como directriz de las actividades de todas las demás células de respuesta inmunitaria. La función primaria del linfocito es reaccionar con antígenos y trabajar con monocitos para modular la respuesta inmunitaria.

Linfopoyesis

La línea celular linfoide surge de la célula madre pluripotencial que se encuentra en la médula ósea. Dicha célula da origen a dos células madres restringidas: de linfoide y la mioide. La primera se diferencia y madura, bajo la influencia inductiva de microambientes selectivos, en dos tipos de linfocitos de morfología idéntica, pero inmunológica y funcionalmente diversos: linfocitos T y linfocitos B.



La linfopoyesis puede dividirse en dos fases diferentes: linfopoyesis independiente de antígeno (figura 4) y linfopoyesis dependiente de antígeno. La primera tiene lugar en el tejido linfoide primario (médula ósea, timo, hígado fetal, saco vitelino). Este tipo de linfopoyesis se inicia en la célula madre linfoide inhibida y forma linfocitos T o B inmunocompetentes (llamados erróneamente "vírgenes" ya que no han reaccionado aún con antígenos). La linfopoyesis dependiente de antígeno ocurre en el tejido linfoide secundario (médula ósea del adulto, bazo, ganglios linfáticos, tejido linfoide del intestino) y empieza con el estímulo antigénico de los linfocitos T y B inmunocompetentes. Este tipo de linfopoyesis termina en la formación de linfocitos T y B efectores que median la respuesta inmunitaria a través de la producción de linfocinas (linfocitos T) y anticuerpos (linfocitos B).

Linfopoyesis independiente de antígeno

Se reconocen tres etapas de maduración morfológica en la médula ósea: linfoblasto, prolinfocito y linfocito.

- **Linfoblasto.** Esta célula tiene un diámetro aproximado de 10 a 20 μm con una proporción núcleo citoplasma elevada. El núcleo contiene cromatina en filigrana fina; pero aparece más manchado o denso que en los mieloblastos. Son visibles uno o dos nucleolos definidos en una tonalidad azul pálida. La membrana nuclear es densa y puede observarse una zona perinuclear clara. El citoplasma agranular es más escaso que en otros blastos de glóbulos blancos y se tiñe de azul intenso. No poseen peroxidasa, lípidos ni esterasas, pero tienen fosfatasa ácida y, en ocasiones, depósitos de glucógeno.

- **Prolinfocito.** Es muy difícil de distinguir en muestras de médula ósea normal. Es algo menor que el linfoblasto y su proporción núcleo citoplasma más baja. La cromatina es densa pero con una dispersión más fina que la del linfocito; por lo general, posee nucleolos. El citoplasma es azul claro y agranular.

- **Linfocito.** Estas células maduras se clasifican por lo general en linfocitos pequeños y grandes. El tamaño de los linfocitos pequeños oscila de 7 a 10 μm y constituye la mayor parte. La cromatina esta muy condensada y se tiñe de color púrpura intenso. Aunque siempre hay nucleolos, son visibles solo en ocasiones con el microscopio de luz como áreas claras pequeñas dentro del núcleo. Los linfocitos son móviles y pueden presentar una forma peculiar de " espejo de mano" en los frotis de sangre. Estas células tienen el núcleo en la porción anterior redondeada, seguido por una sección alargada de citoplasma conocida como uropodo. Los linfocitos grandes son heterogenos y su tamaño varía de 11 a 16 μm . El núcleo puede ser un poco mayor que en los linfocitos pequeños; pero la diferencia en el tamaño celular obedece en gran parte a una cantidad mayor de citoplasma. Este puede tener color azul claro con basofilia periférica o ser azul más oscuro que en el linfocito pequeño. Pueden destacarse gránulos azurófilos, éstos difieren de aquellos de las células mielocíticas en que no poseen peroxidasa. La cromatina nuclear es semejante a la de los linfocitos pequeños y el núcleo puede tener una pequeña depresión. Es probable que estas células grandes, igual que las pequeñas, representen una diversidad de subpoblaciones funcionales (McKenzie, 1991).

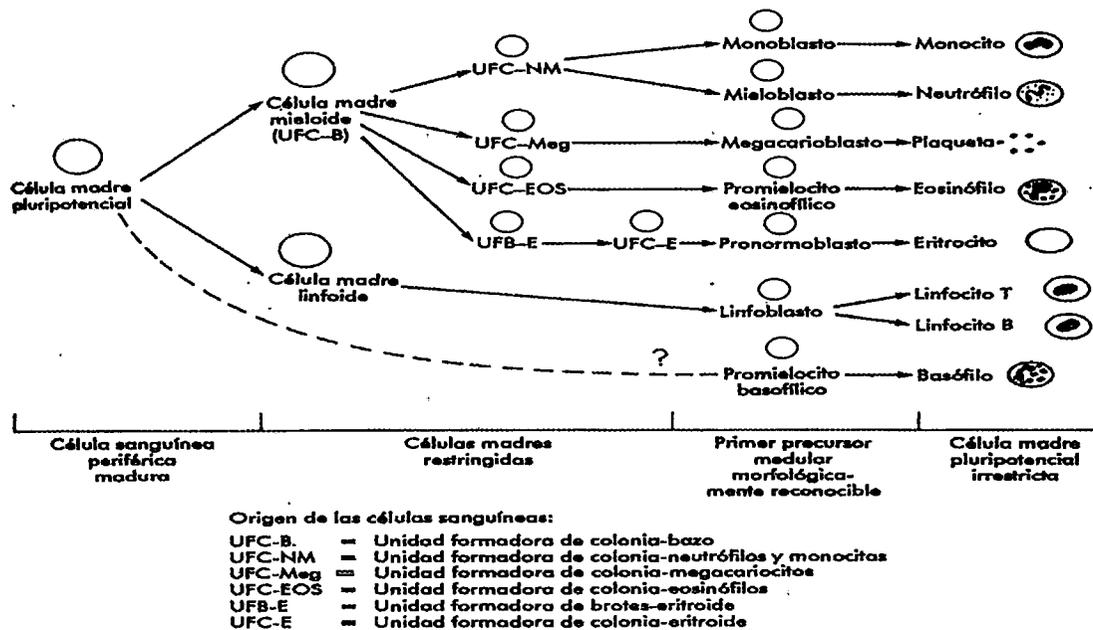


FIGURA 4. Linfopoyesis independiente de antígeno.

Linfocitos B

Subpoblación de linfocitos generados en la médula ósea y cuya principal característica es la de ser las únicas células del organismo capaces de producir y liberar anticuerpos. De esta manera, son capaces de proporcionar defensa ante microorganismos, incluyendo bacterias y virus. Los linfocitos B se encuentran en las áreas foliculares de los ganglios linfáticos y en la sangre periférica, constituyendo cerca del 30% del total de los linfocitos circulantes. Son la base celular de la denominada inmunidad humoral, que se inicia por la interacción de los antígenos con un número pequeño de linfocitos B específicos para cada antígeno, que expresan en su membrana IgM e IgD. Esta interacción entre el antígeno y las inmunoglobulinas de membrana de los linfocitos B inicia una serie de respuestas que producen dos cambios fundamentales en ese clon de células B: la proliferación, que da lugar a la expansión del clon, y la diferenciación a células plasmáticas capaces de producir anticuerpos específicos frente a dicho antígeno.

Linfocito T

Subpoblación de linfocitos generada en el timo a partir de precursores surgidos en la médula ósea, cuya principal función es la inmunidad mediada por células y la cooperación con los linfocitos B en la síntesis de anticuerpos dirigidos específicamente contra antígenos timodependientes. Las células T maduras se clasifican en base a sus marcadores de superficie en dos poblaciones principales: los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD4+ reconocen el antígeno en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, mientras que los linfocitos T CD8+ reconocen el antígeno en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I. Los linfocitos T CD4+ desempeñan una función crucial en la respuesta inmunitaria, ya que tras reconocer el antígeno y activarse, ayudan a las demás células inmunitarias a ejercer sus funciones, motivo por el cual reciben la denominación de linfocitos T ayudadores (helper). Por su parte, los linfocitos T CD8+ ejercen fundamentalmente funciones citotóxicas, eliminando células tumorales y células infectadas por virus.

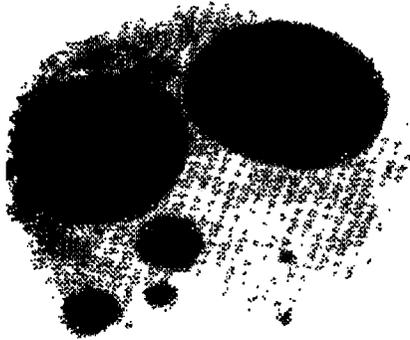
Cinética del linfocito

Los linfocitos se encuentran en la sangre del adulto en una concentración de 1.5 a $4.0 \times 10^9/\text{lt}$ (20 a 40% de los leucocitos sanguíneos). La cuenta leucocitaria normal en los primeros 10 años de vida varía de 1.5 a $11.0 \times 10^9/\text{lt}$, según la edad del niño. Al nacer, la cuenta linfocitaria media es de $5.5 \times 10^9/\text{lt}$ (30%). Este valor se eleva a una media de $7 \times 10^9/\text{lt}$ (60%) en los siguientes 6 meses. A los 4 años de edad se observa un decremento gradual de linfocitos hasta que alcanza los valores normales del adulto a los 8 años. Aunque los linfocitos ocupan el segundo lugar en cuanto al número de leucocitos intravasculares en el adulto, los de sangre periférica comprenden sólo 5% de la concentración corporal total. 95% de los linfocitos se localiza en el tejido extravascular de ganglios linfáticos y bazo (McKenzie, 1991).

Hay un movimiento continuo de linfocitos entre los compartimientos intravascular y extravascular. Los linfocitos de los ganglios linfáticos pasan a la linfa y logran infiltrarse en la sangre al drenar la linfa los conductos linfáticos derecho y torácico. Si a los linfocitos sanguíneos los estimula un antígeno, estos emigran a áreas específicas del tejido linfoide donde proliferan y se transforman en células efectoras. Estas células pueden pasar directamente a través del citoplasma de células poscapilares o de endotelio de las venulas (emperipolesis) cuando circulan entre los compartimientos intravascular y extravascular. Debido a este proceso único de recirculación, proliferación y transformación, es difícil determinar la longevidad de los linfocitos. Las células salen de la sangre y regresan a ella numerosas veces. Es consenso general que la mayor parte de los linfocitos (80%) de la sangre periférica es de larga vida, con duración de algunos meses hasta veinte años. Estos linfocitos de existencia duradera incluyen células T y B, pero predominan los linfocitos T. Estas células pasan gran parte de su vida en una fase G_0 intermitótica prolongada. El 20% restante de linfocitos vive de algunas horas a 5 días y aunque incluyen linfocitos T y B predominan éstos últimos.

Características del bioensayo

La técnica de micronúcleos es un método para medir el *daño cromosomal*. Los micronúcleos son fragmentos o cromosomas enteros encerrados acéntricamente que no pueden ser incorporados al núcleo principal durante la división celular por diversas causas.



Con la adición de citocalasina B (Cyt-B) en el cultivo celular se bloquea la citocinesis inhibiendo la división nuclear, estas células se acumulan en el ciclo de la primera división y son fácilmente reconocibles debido a su apariencia binucleada y por la presencia de micronúcleos (Figura 5).

FIGURA 5. Micronúcleo en linfocito binucleado.

El método de bloqueo de citocinesis aparece como un procedimiento escogido para cuantificar MN en linfocitos (Fenech, 1985).

El MN no puede observarse sino hasta después del primer ciclo celular, la frecuencia de MN dentro de una población celular es alta dependiendo de la proliferación celular. Esta proliferación probablemente varía ampliamente, dependiendo de las especies, el tejido o de condiciones ambientales. Por lo tanto, no es posible establecer un tiempo para el rendimiento óptimo de MN después de la exposición a agentes genotóxicos sin el trabajo considerable para normalizar procedimientos de ensayo. Sin embargo, agregando Cyt-B al cultivo celular, la citocinesis se bloquea sin la adición de un inhibitorio de la división nuclear por ser un inhibidor de la acción de la polimerización (Figura 6) (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Falck, 1997).

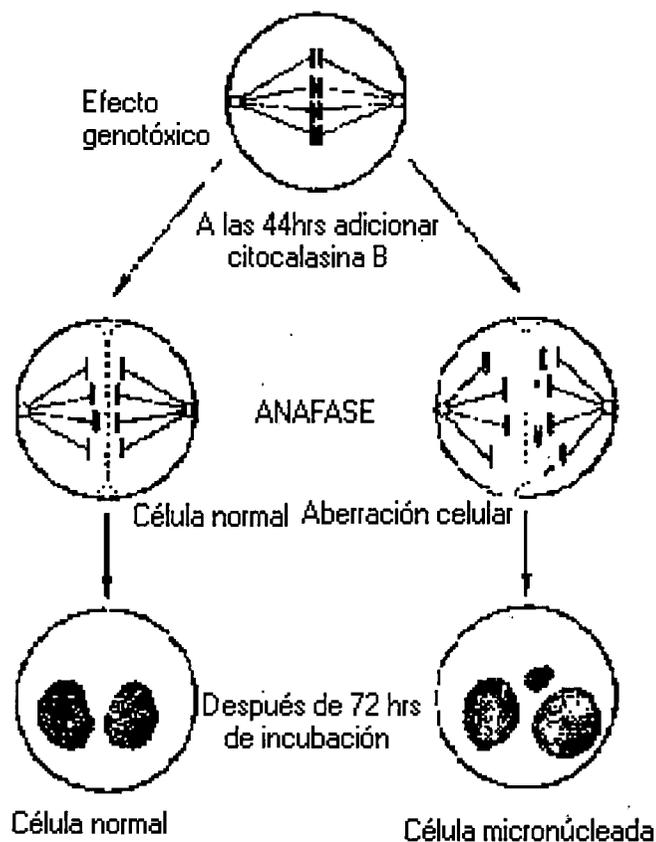


FIGURA 6. Mecanismo de formación de micronúcleos en células de linfocitos binucleadas (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

Este método para el análisis de MN se aplica como una prueba *in vitro* para detectar la genotoxicidad y como un ensayo *in vivo* para ver la exposición humana a agentes genotóxicos.

El valor y sensibilidad de esta prueba para evaluar mutagénesis ha sido bien demostrado por décadas, y debido a que su formación involucra daño cromosómico, recientemente se ha estudiado como un marcador de riesgo para desarrollar cáncer (Garewal y col., 1993).

Ventajas del uso de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana

- Es una técnica simple y confiable para dosimetrías biológicas de exposición a la radiación u otras formas de agentes genotóxicos
- El método de micronúcleos en cultivo de linfocitos es sensible, rápida y de bajo costo.
- Es una prueba sencilla, muy relevante para evaluar daño cromosómico inducido por agentes genotóxicos.
- Es útil para evaluar diferentes compuestos químicos y agentes físicos potencialmente genotóxicos.
- También asegura que el registro de micronúcleos se realice en células que solo han experimentado un primer ciclo de división celular y que los micronúcleos solo sean inducidos por el compuesto que se evalúa y no por la citocalasina B como ocurría con la metodología tradicional que empleaba como biomarcadores de primer ciclo de división la Timidina Tritiada y la Bromodioxiuridina, sustancias que por sí mismas inducían micronúcleos.
- También tiene la potencialidad para permitir la cuantificación de micronúcleos por exposición de los linfocitos a agentes genotóxicos *in vitro*.

Desventajas del uso de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana.

- Desafortunadamente los linfocitos de cada individuo responden de manera diferente a la fitohemaglutinina.
- Se corre el riesgo de contaminación.

- Se tiene que procesar la muestra en un lapso de tiempo no mayor de 24 hrs., por la vida media del linfocito.
- El proceso tiene que ser en condiciones estériles.

5.2 Ensayo de micronúcleos en células epiteliales orales.

El tejido epitelial se compone de células poliédricas, entre las cuales hay muy poca sustancia intercelular. La adhesión entre estas células es fuerte. Las células epiteliales se derivan de 3 hojas embrionarias germinativas (ecto, endo y mesodermo). La mayoría del epitelio que forma la piel, boca, nariz, y el ano tiene un origen ectodérmico. El revestimiento del sistema respiratorio, la vía digestiva, y las glándulas de la vía digestiva (ej. el páncreas y el hígado) se derivan de el endodermo. El otro epitelio es el mesodermo.

Cavidad oral

La cavidad oral está revestida por las mucosa masticatoria, de revestimiento y especializada.

- Mucosa masticatoria

La mucosa masticatoria se encuentra en las encías y en el paladar duro. Está formada por el epitelio estratificado plano queratinizado o paraqueratinizado.

Epitelio queratinizado: se asemeja a de la piel, pero carece de estrato lúcido.

Epitelio paraqueratinizado: es similar al queratinizado, salvo en que las células del estrato córneo no pierden sus núcleos y el citoplasma no se tiñe intensamente con la eosina.

Al igual que en la piel, la profundidad y la cantidad de papilas contribuyen a la relativa inmovilidad de la mucosa masticatoria, lo cual la protege de las tensiones por fricción y por deslizamiento. Salvo en algunos sitios del paladar duro, la mucosa está firmemente adherida al hueso subyacente, y la capa reticular de la lámina propia se mezcla con el periostio.

- Mucosa de revestimiento

La mucosa de revestimiento se encuentra en los labios, las mejillas, la superficie mucosa alveolar, el piso de la boca, las superficies inferiores de la lengua y el paladar blando. Esta mucosa tiene papilas más escasas y más cortas, por lo que se puede ajustar a los movimientos de los músculos subyacentes.

Por lo general, el epitelio es no queratinizado, si bien en algunos sitios puede ser queratinizado. El epitelio del borde bermellón de los labios es queratinizado. El epitelio de revestimiento no queratinizado es más grueso que el epitelio queratinizado. Consiste en tres capas :

- Estrato basal
- Estrato espinoso
- Estrato superficial

Las células del epitelio de la mucosa son similares a las de la epidermis de la piel, incluso con los queratinocitos, las células de Langerhans, los melanocitos y las células de Merkel (Ross y *col.*, 1997).

- Mucosa especializada

La mucosa especializada está restringida a la superficie dorsal de la lengua; contiene papilas y botones gustativos.

Formas y características de las células epiteliales

Las formas y las dimensiones de las células epiteliales varían. Su forma común polihedral es por su yuxtaposición en las masas o capas celulares. Un fenómeno similar podría observarse si un número grande de los glóbulos rojos inflados de goma se comprimieran en un espacio limitado. Los núcleos de las células epiteliales tienen un aspecto distintivo, variando desde esférico a elongado o elíptico en la forma. La forma nuclear corresponde ásperamente a la forma de célula; así, células cuboidales tienen núcleos esféricos y las células aplanadas, núcleos elípticos. El eje largo del núcleo es siempre paralelo al eje principal de la célula.

La observación del núcleo de la célula es de gran importancia porque da una pista indirecta de la forma y el número de células. Este es también de valor para observar el arreglo en capas, que es una morfología primaria y sirve de criterio para clasificar el epitelio (Junqueira y *col.*, 1993).

Renovación celular

El índice de renovación o de reemplazo celular es característico de cada epitelio específico. El epitelio estratificado de la piel es reemplazado en su mayor parte en un periodo de unos 28 días. En este caso, las células de la capa basal de la epidermis, denominado adecuadamente estrato germinativo, sufre actividad mitótica para proporcionar la renovación celular. A medida que estas células se diferencian son empujadas a la superficie por las de renovación formadas después en la capa basal. Por último, las células se queratinizan y se descaman. En este caso se mantiene un estado estable relacionado con la cantidad de células en el epitelio, donde las células nuevas normalmente reemplazan a las células que descaman con índices similares (Ross y *col.*, 1997).

El ensayo de micronúcleos en células exfoliadas es una técnica innovadora de genotoxicidad que tiene promesa para el estudio de carcinógenos epiteliales.

Atipias nucleares

En la inspección celular se pueden encontrar atipias anormalidades nucleares y son las siguientes (Figura 7) :

- **Binucleadas**, o la presencia de dos de núcleos dentro de una célula. Las células, binucleadas no involucran directa interacción con ADN, pero preferentemente involucran la interferencia con eventos que ocurren en división celular tardías, las consecuencias de la binucleación son desconocidas.
- **Núcleos “broken-egg”** o núcleos gemados. El núcleo se observa con un desprendimiento del material nuclear que permite suponer el origen de un MN o por lo contrario su fusión con el núcleo principal. Su origen y significado es desconocido.
- **Picnosis** o núcleos encogidos. El núcleo se observa disminuido de tamaño y citoplasma normal.
- **Núcleo con cromatina condensada**, en que la cromatina parece agregada (se aprecia como panal de abeja). Es normal y se correlaciona con la diferenciación celular epitelial y su maduración. Sin embargo esto también ocurre en respuesta al daño celular.
- **Núcleo en cariorrexis**, o el desintegración nuclear que involucra pérdida de integridad de núcleo, los bordes de la membrana nuclear no se aprecian con claridad.
- **Núcleos en cariólisis**, o la disolución nuclear, dan una respuesta débil a la tinción de Feulgen y se observan como un fantasma o remanente del núcleo (disolución nuclear).

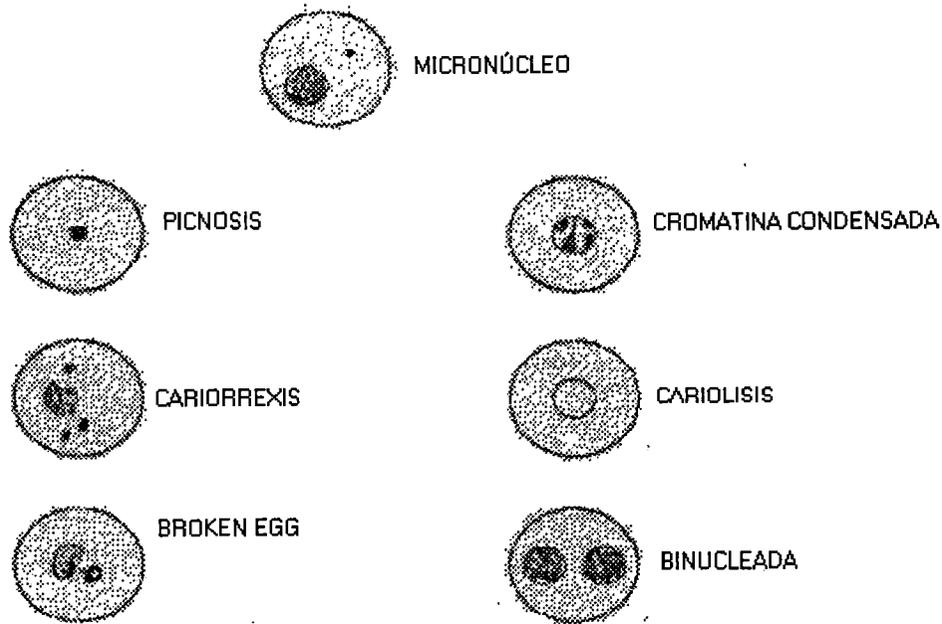


FIGURA 7. Células con micronúcleo y atipias nucleares (Tolbert y *col.*, 1992).

La binucleada probablemente no involucra la interacción directa con sucesos que ocurren en célula división tardía. Las consecuencias de células binucleadas son desconocidas. "Los núcleos gemados" se ha aplicado recientemente al aspecto nuclear muy anormal de importancia y origen desconocido.

Picnosis y cromatina condensada son formas normales de diferenciación y maduración del epitelio celular. Sin embargo, estos aumentan cuando hay daño celular.

La picnosis, la cromatina condensada y la cariólisis acompañan a la queratinización, que es una respuesta adaptativa a lesiones celulares en un epitelio que normalmente no se queratiniza.

Picnosis, cromatina condensada y cariorrexis (pero no cariólisis) y "broken-egg" acompañan estadios tempranos de otro tipo de muerte celular, la apoptosis. Se pensó que este tipo de muerte celular ocurría en tejidos vivos bajo control fisiológico y efectos ordinarios de muerte tales como los que ocurren en la embriogénesis y en el recambio de células normales (Wyllie, 1981). Sin embargo, la apoptosis es estimulada tanto por radiaciones ionizantes como por ejemplo compuestos químicos que se unen al ADN o por desregulación genética también puede actuar como un mecanismo de reconocimiento, eliminando células con daño genético; así, la apoptosis en exceso de los niveles normales, puede ser un indicador de daño genotóxico Figura 8 (Tolbert y *col.*, 1992). A diferencia de la necrosis, en donde la fragmentación del ADN ocurre después de la muerte celular; durante la apoptosis, la fragmentación precede la muerte (Kyprianou y *col.*, 1990) se ha visto que en la mucosa bucal hay marcados cambios estructurales con la edad. El epitelio se adelgaza, varía el tamaño y la forma de las células y sus núcleos, existe una mayor desfoliación y queratinización celular. También hay un aplanamiento de la interfase en el epitelio del tejido conectivo, por disminución de los brotes y cordones epiteliales; estos cambios se incrementan cuando hay déficit nutricional de hierro y de vitaminas del grupo B (Gurrión 1999).

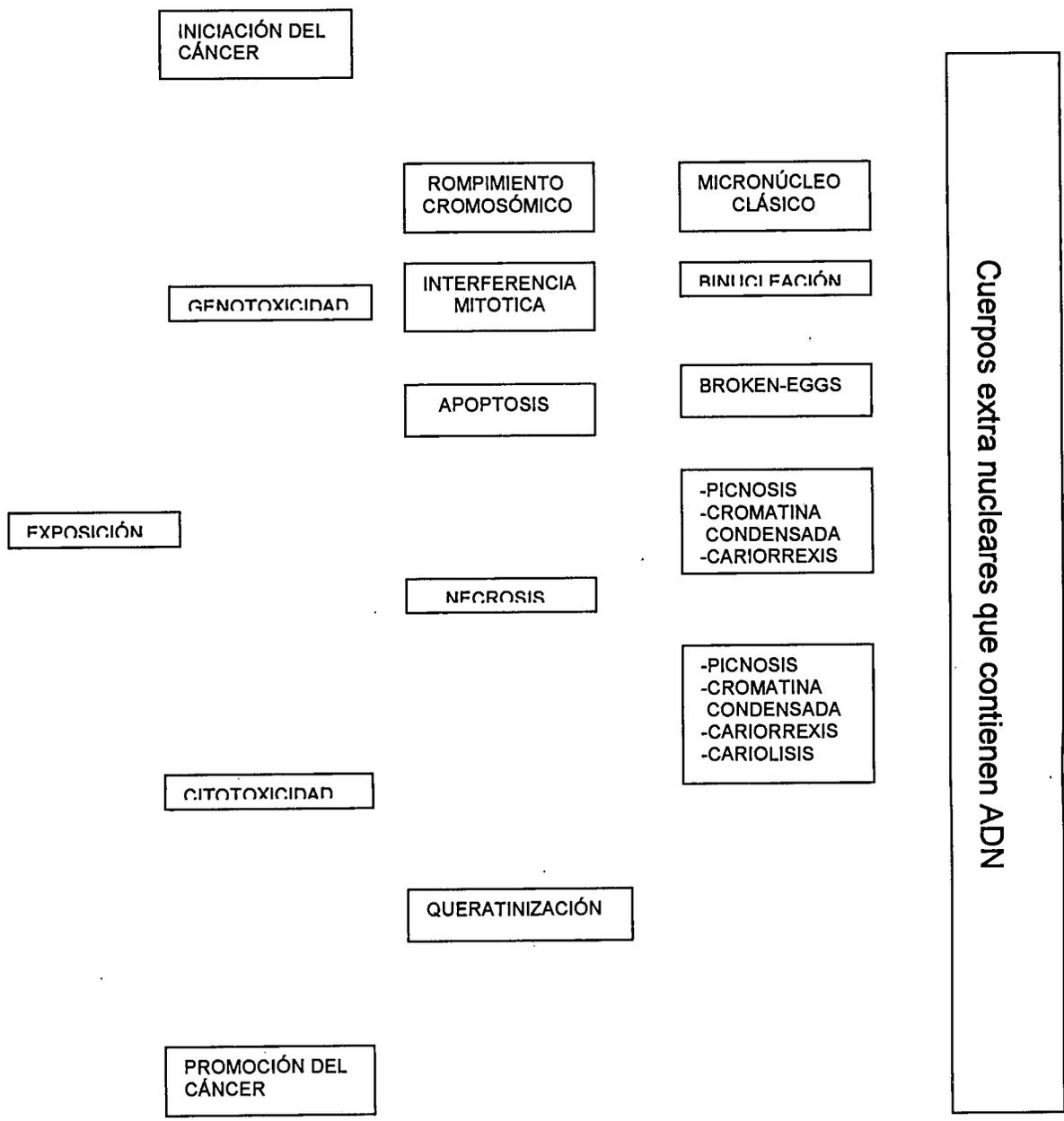


FIGURA 8. Postulados de procesos que dan origen a micronúcleos y otras atipias nucleares (Tolbert y *col.*, 1992).

La atipia cariorrexis es frecuente y sumamente difícil distinguir de micronúcleo, y cromatina condensada. Aunque las otras anomalías también se asocien con necrosis (picnosis y cariólisis) y apoptosis (picnosis) son fácilmente distinguibles desde la micronucleación.

Ventajas del uso de micronúcleos en células epiteliales orales.

- El tejido blanco puede estudiarse directamente.
- Los linfocitos deben estimularse para experimentar mitosis, a diferencia de las células epiteliales que no necesitan ser estimuladas.
- Los micronúcleos en células exfoliadas reflejan sucesos genotóxicos que ocurrieron en las capas basales 1-3 semanas anteriores (stich y col., 1983).
- La técnica es no invasiva.

Desventajas del uso de micronúcleos en células epiteliales orales.

- Se trabaja con tejido muerto.
- Recambio de células epiteliales aproximadamente cada 28 días.
- Detecta solo daño cromosómico que da origen a MN y no a todo el daño que ha ocurrido.

6. IMPACTO POR LA EXPOSICIÓN A SUSTANCIAS TÓXICAS EN LA SALUD HUMANA.

Desde hace años existe mucha preocupación de que la exposición a sustancias tóxicas sean factores que contribuyan a que se den varias clases de enfermedades muy severas como son las genéticas, incluyendo el cáncer, las congénitas, ataques al corazón, paros cardiacos y envejecimiento prematuro. La causa inicial de ciertas enfermedades es una mutación del material genético de una célula.

Esta clase de enfermedades se da porque el ADN puede ser lesionado por agentes físicos (ej. radiaciones), químicos y biológicos, así como por productos del metabolismo celular (ej. radicales libres). Como consecuencia importante de esta acción genotóxica son la muerte celular y la ocurrencia de cambios en el mensaje genético, o mutaciones.

La importancia de las mutaciones y alteraciones cromosómicas para la salud humana es evidente por los desordenes genéticos y el cáncer.

Las mutaciones se pueden dar en células germinales y células somáticas:

6.1 Mutación en células germinales

Las mutaciones germinales, afectan a las células germinales de un individuo, es decir, a las células precursoras de gametos y, por tanto, se transmiten a la descendencia. Estas son, pues, las mutaciones más importantes, debido a que se transmiten a la progenie.

Por otro lado, las mutaciones pueden afectar a los cromosomas sexuales (heterocromosomas) o a los autosomas (cromosomas no determinantes del sexo).

Las mutaciones que generalmente se ven aquí son las de sustitución de pares de bases. Muchos desordenes genéticos (ej. fibrosis quística, fenilcetonuria y enfermedad de Tay-Sachs) son causados por la expresión de mutaciones recesivas. Estas mutaciones son principalmente heredadas y se expresan cuando un individuo hereda el gen mutante de ambos padres. La mutación heredada hace una gran contribución a la incidencia de enfermedades dominantes comparativamente a enfermedades recesivas porque solo una simple mutación dominante es requerida para su expresión. Estas nuevas mutaciones son expresadas en la primera generación. Las aberraciones cromosómicas pueden causar muerte fetal o serias anormalidades que ocurren en la etapa prenatal. La aneuploidía también contribuye a la muerte fetal y causa desordenes como el Síndrome de Down. Aproximadamente 4 infantes de 1000 tiene síndromes asociados a anormalidades cromosómicas, incluyendo translocaciones y aneuploidía. La mayoría de estos síndromes (85%) son trisómicos (Curtis, 1996).

6.2 Mutación en células somáticas

Este tipo de mutación se produce solo en células somáticas y, por tanto, no se transmiten a la descendencia. Estas mutaciones desaparecen con la muerte del individuo en las que han aparecido. También se les da el nombre de aberraciones.

Los síndromes de inestabilidad y reparación deficiente del ADN se asocian con en el riesgo de cáncer. El cáncer citogenético ha fortalecido mucho la asociación en que las alteraciones cromosómicas, incluyendo eliminaciones, translocaciones, y la inversión, se han implicada en leucemias y linfomas así como también en algunos tumores sólidos (Rabbitts, 1994).

III. HIPOTESIS

La exposición a contaminantes ambientales en un ambiente ocupacional produce daño genotóxico en los humano.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el daño genotóxico mediante biensayos que evalúan las frecuencias de micronúcleos en células humanas en grupos de individuos expuestos a diferentes contaminantes

OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar la técnica que evalúa micronúcleos de linfocitos en sangre periférica humana.

Utilización de la prueba de micronúcleos por el método de células epiteliales orales.

Comparar los resultados de la frecuencia de micronúcleos obtenidos por los bioensayos de linfocitos humanos y células epiteliales orales.

Divulgar y publicar datos confiables que permitan alertar sobre los riesgos potenciales para la salud en personas expuestas a contaminantes ambientales ocupacionales.

V. METODOLOGÍA

1. Individuos expuestos

Se seleccionaron 5 grupos de 10 individuos voluntarios los cuales se les considero como individuos expuestos a compuestos químicos genotóxicos en su lugar de mayor permanencia y su nivel ocupacional (Cuadro 3). También se escogió otro grupo de individuos con las mismas condiciones socioeconómicas, las cuales no están expuestas a ningún tipo de contaminante, que sirvieron como controles negativos. Las edades de estos grupos de personas varia desde 17-50 años. Se les aplicó un cuestionario que incluye antecedentes ocupacionales, tabaquismo, alcoholismo, enfermedades, también años de laborar en ese oficio, etc. (ANEXO I).

CUADRO 3. Características de los grupos de individuos estudiados.

OCUPACIÓN	UBICACIÓN	EXPOSICIÓN A AGENTES QUÍMICOS
Zona minera (P)	Plazuelas, Peñamiller Qro.	Mercurio.
Gasolineros I (GI)	Colinas del Cimatario	Hidrocarburos, benceno, SO ₂ , NO _x , CO ₂ , CO, NO, NO ₂ , vapores y partículas orgánicas, mercaptanos, óxidos de azufre, formaldehído, acroleína, 1-nitropireno, 1-nitroftaleno.
Agentes de tránsito (AT)	Prolongación Zaragoza	Hidrocarburos, benceno, SO ₂ , NO _x , CO ₂ , CO, NO, NO ₂ , vapores y partículas orgánicas, mercaptanos, óxidos de azufre, formaldehído, acroleína, 1-nitropireno.

OCUPACIÓN	UBICACIÓN	EXPOSICIÓN A AGENTES QUÍMICOS
Gasolineros II (GII)	Carrillo	Hidrocarburos, benceno, SO ₂ , NO _x , vapores y partículas orgánicas, mercaptanos, óxidos de azufre, formaldehído, acroleína, 1-nitropireno, 1-nitroftaleno CO ₂ , CO, HS, alquitrán de hulla y derivados, amoníaco, anilina y derivados, tolueno, xileno, etc.
Fumadores (F)		CO, NO _x , HCN, nitrosaminas, benceno, benzo(a)pirenos, partículas, formaldehído, nicotina, acroleína, cianuros, acetona, amoníaco, benzopirinas, oxinicotina.
Comunidad rural (CN)	Villa corregidora Qro.	Comunidad sin contaminación ambiental aparente.

ZONA MINERA: Comunidad rural que se encuentra expuesta a mercurio ya sea en el agua, suelo y aire.

GASOLINEROS I: Su lugar de trabajo de este grupo de individuos esta localizado en una zona residencial, en avenida cimatarío con Luis M Vega y Monroy. La contaminación ahí existente es por gasolina y vehicular.

AGENTES DE TRÁNSITO: Individuos que laboran en Zaragoza con 5 de Febrero, es una de las zonas con más tráfico vehicular tanto ligero como pesado.

GASOLINEROS II: Individuos que laboran en una gasolinera que se encuentra localizada en una zona industrial entre Carrillo y avenida Revolución, en éste lugar hay contaminación derivada de emisiones de tipo vehicular e industrial y de gasolina.

FUMADORES: Estos individuos son fumadores crónicos debido a que el consumo de cigarrillos de tabaco es de 1 a 2 cajetillas diarias.

2. Bioensayos

2.1.- Bioensayo de micronúcleos en Linfocitos de Sangre Periférica Humana (Hum-PLMN).

2.2.- Prueba de micronúcleos en células epiteliales orales.

3. Obtención de la muestra

Linfocitos

Se obtuvo la muestra de sangre por punción venosa y se colectó en un tubo estéril con EDTA como anticoagulante, la cual se llevó al laboratorio a temperatura ambiente para procesarse antes de que transcurrieran 24 hrs.

Células epiteliales orales

Los voluntarios se enjuagarón la boca con agua y con un hisopo de madera se raspó suavemente la mucosa oral. La muestra se depositó en un tubo que contenía metanol absoluto. Después se transportaron al laboratorio en un contenedor con hielo.

4. Cultivo de linfocitos

Se siguió la técnica descrita por Fenech (1985), se utilizarón 0.5 ml de sangre completa para cultivar en 4.5 ml de medio McCoy suplementado con 20% de suero fetal de ternera (medio de enriquecimiento), penicilina y estreptomycinina para evitar el desarrollo bacteriano. Se estimuló la división celular de los linfocitos con Fitoheماغlutinina (FHA) 6.0 µg/ml. Las muestras se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂.

4.1 Cosecha de linfocitos

A las 44 hrs de incubación se agregó 200µl de Citocalasina B (CYB) para binuclear las células. Los cultivos se cosecharon a las 72 hrs de su iniciación, centrifugando las muestras a 1000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Después se agregó una solución hipotónica (KCl 0.075M) dejando en reposo 3 min para lisar los eritrocitos y hacer más grandes los linfocitos, se centrifugó 10 min a 1000 rpm., se resuspendió el botón agregando gota a gota 5 ml de una mezcla fijadora de metanol : ác. acético (3:1) sin dejar de agitar y después se dejó en reposo a temperatura ambiente, después se centrifugó a 1000 rpm por 5 min y se repitió este paso de 3 a 4 veces o hasta que el sobrenadante fue translúcido y había un botón blanquecino.

Finalmente se resuspendió el botón blanco con 0.3 ml de la misma solución y se gotearon los portaobjetos a una distancia considerable; se dejaron secar las laminillas al aire. Una vez secas se tiñeron con Giemsa.

4.2 Tinción de las laminillas

Se sumergieron las laminillas en cajas Koplín que contenían colorante de Giemsa: agua destilada 1:6 por 10 min, se lavaron con agua destilada y se dejó secar al aire.

4.3 Observación al microscopio y recuento de micronúcleos

La observación al microscopio se hizo con el objetivo de inmersión y se contaron aproximadamente 1500 a 2000 linfocitos por cada cultivo por duplicado. El criterio para identificar los MN fue: localización dentro del citoplasma, con contorno liso, no refractorio, teñido con la misma intensidad que el núcleo principal, y más pequeño que el núcleo.

5. Preparación de muestras del epitelio oral

Una vez en el laboratorio las muestras de células epiteliales se centrifugaron durante 10 min a 1200 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregó un volumen equivalente de metanol fresco. Las muestras no procesadas se guardaron en refrigeración. El botón celular se resuspendió y se goteó sobre portaobjetos limpios, desengrasados y codificados para su análisis. Las muestras se dejaron secar al aire para posteriormente proceder a procesarlas para efectuar la tinción de Feulgen.

5.1 Tinción de Feulgen Modificada

Las laminillas con las muestras se procesaron según Gurr (1965) de la siguiente manera: se colocaron en cajas Koplín que contenían HCl 1N por 1 min a temperatura ambiente para la hidrólisis, se sacaron y se transfirieron a HCl 1N a 60°C por 10 min y después a HCl 1N a temperatura ambiente por 1 min., luego de la hidrólisis se enjuagaron las laminillas. Se tiñeron con el reactivo de Schiff por 1 hr (Tolbert y *col.*, 1992), pasado el tiempo se enjuagaron con agua de la llave por 30 seg, y se dejó secar.

5.2 Observación al microscopio y recuento de micronúcleos

Se observaron con el objetivo de 40X para ver la cantidad de células y después con de 100x a fin de observar los MCN. Se contaron aproximadamente 1000 células y se contaron las micronucleadas y otras atipias (anormalidades) nucleares como son: la cromatina condensada, cariolisis, cariorrexis, binucleada, picnosis, "broken-egg", y se tomaron en cuenta los siguientes criterios: (1) citoplasma intacto y relativamente plano; (2) poca o ninguna superposición con células adyacentes; (3) desechos celulares (debris) y (4) núcleo normal y el perímetro nuclear intacto y distinto. Una célula para ser considerada micronucleada debe satisfacer los criterios con respecto a la inclusión en la célula total, para micronúcleos se requiere que encuentre los criterios siguientes: (1) perímetro liso redondo sugestivo de membrana; (2) menos de un tercio el diámetro del núcleo asociado, pero suficientemente grande para discernir forma y color; (3) tinción de Feulgen – positivo; (4) intensidad de color parecida al del núcleo; (5) textura parecido al del núcleo; (6) mismo plano focal; y (7) la ausencia de superposición con el núcleo.

6. Análisis estadístico

Se calculó el promedio, la desviación estándar y error estándar para las frecuencias de micronúcleos y cada una de las atipias.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de "t" de Student. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$.

Para evaluar el grado de significancia en la frecuencia de MN de los grupos de individuos con hábitos personales (fumar-alcohol) con respecto al grupo control se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$

VI. RESULTADOS

El cuadro 4 contiene los datos generales de las poblaciones expuestas a contaminantes laborales; como son edad y hábitos personales (fumar, alcohol y medicamentos). Del total el 62% de los entrevistados pertenecieron al sexo masculino, mientras que el 28% al femenino. Sus edades oscilaban entre 20 y 60 años.

Las cuadro 5 y 6 muestran las frecuencias de micronúcleos tanto en linfocitos humanos como en células epiteliales orales, así como las frecuencias de las atipias nucleares, también se puede observar su media, desviación estándar y error estándar de cada grupo.

La cuadro 7 muestra los resultados de los análisis estadísticos en los 2 bioensayos, en donde se observa que todos los grupos de individuos tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo control cuando se utilizó el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana, mientras que en células epiteliales orales se encontraron diferencias significativas sólo entre los individuos de Plazuelas y el grupo de fumadores.

En las figuras 9 y 10 se pueden observar las gráficas de las frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos y en células epiteliales orales, siendo el grupo de individuos de Plazuelas el que resultó con la frecuencia de micronúcleos más elevada en los dos bioensayos.

El cuadro 8 muestra el análisis estadístico de micronúcleos de los dos bioensayos en individuos de acuerdo con sus hábitos personales de fumar y alcoholismo

usando la prueba de U de Mann-Whitney. Donde se observa diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.0002$) en el bioensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana, mientras que el bioensayo de micronúcleos en células epiteliales no se observaron diferencias significativas con respecto control ($p = 0.3242$).

La figura 11 muestra el efecto de la edad en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos, donde se muestra el mayor valor de la media y error estándar (4.484 ± 1.494) en el grupo de 50 a 59 años.

Se observa en la figura 12 el efecto de los hábitos personales en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana y se observó que el los individuos con el hábito del alcohol presentan una media de la frecuencia de MN y error estándar (5.7875 ± 1.456) por encima de los individuos con otros hábitos.

En las figuras 13 y 14 se observa que el grupo de individuos con edad de entre 20 y 29 años presentan una mayor frecuencia de micronúcleos en célula epiteliales orales (1.445 ± 0.3504) y que los individuos con el hábito del alcohol presenta una frecuencia que esta por arriba de los demás hábitos personales (2.333 ± 0.7601).

Se muestra en la figura 15 las frecuencias de las diferentes atipias nucleares, siendo las más abundantes las que presentan núcleos con cariólisis, cariorrexis y cromatina condensada.

Las figuras 16, 17, 18 y 19 presentan algunos ejemplos de células de linfocitos y células epiteliales orales observadas en el microscopio en este trabajo.

CUADRO 4. Datos generales de los individuos expuestos a contaminantes.

INDIV	EDAD	FUMADOR	ALCOHOL	MEDICAMENTOS
31	41	NO	SI	NO
32	36	NO	SI	NO
33	40	NO	NO	NO
34	29	NO	SI	NO
35	35	NO	NO	NO
36	30	SI	SI	NO
37	35	NO	NO	NO
38	40	NO	NO	NO
39	35	NO	NO	NO
40	40	NO	SI	NO
43	26	NO	SI	NO
46	27	NO	NO	NO
58	43	NO	NO	NO
44	34	NO	SI	NO
53	44	NO	SI	NO
54	27	SI	NO	NO
41	36	SI	SI	SI
42	23	SI	SI	NO
43	41	SI	SI	NO
44	58	SI	SI	NO
45	35	NO	SI	NO
48	30	SI	SI	NO
59	25	SI	SI	NO
60	23	SI	SI	NO
61	27	SI	SI	NO
62	24	SI	SI	NO
63	37	SI	SI	NO
64	43	NO	NO	SI
65	37	NO	NO	NO
66	45	SI	NO	SI
67	32	SI	SI	NO
68	25	SI	SI	NO
69	23	SI	SI	NO
70	40	NO	NO	NO
71	20	NO	NO	NO
72	21	SI	SI	SI
73	39	SI	SI	NO
74	40	NO	NO	SI
75	44	SI	SI	NO
76	25	NO	NO	NO
77	41	SI	SI	NO
79	20	SI	SI	NO

INDIV	EDAD	FUMADOR	ALCOHOL	MEDICAMENTOS
195	26	SI	SI	NO
196	61	SI	SI	NO
197	28	SI	SI	NO
198	31	SI	SI	NO
199	55	SI	SI	NO
200	20	SI	NO	NO
201	23	SI	NO	SI
49	37	NO	NO	NO
50	43	NO	NO	SI
51	40	NO	NO	SI
52	39	NO	NO	NO
53	35	NO	NO	NO
54	33	NO	NO	NO
55	22	NO	NO	NO
56	40	NO	NO	NO
57	54	NO	NO	NO

CUADRO 5. Frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana de individuos expuestos a contaminantes.

Clave	Células normales	MN	BE	TOTAL	MCN/ 1000	X	SD	EE
P32	2039	19	0	2058	9.23			
P33	1995	19	0	2014	9.43			
P34	1407	10	2	1419	7.04			
P35	1871	12	0	1883	6.37			
P36	1294	6	1	1301	4.61	5.50	2.82	0.94
P37	2028	6	0	2034	2.94			
P38	1622	8	0	1630	4.90			
P39	1230	1	0	1231	0.81			
P40	2154	9	2	2165	4.15			
GI41	2016	5	1	2022	2.47			
GI42	2380	3	1	2384	1.25			
GI43	1182	1	0	1183	0.84	3.19	2.23	0.91
GI44	2149	13	2	2164	6.00			
GI45	1822	5	1	1828	2.73			
GI48	1866	11	0	1877	5.86			
AT59	2008	8	2	2018	3.96			
AT60	2003	4	0	2007	1.99			
AT61	2006	11	12	2029	5.42			
AT62	2002	7	1	2010	3.48			
AT63	2022	8	3	2033	3.93	3.81	1.25	0.39
AT64	2003	9	1	2013	4.47			
AT65	1957	7	0	1964	3.56			
AT66	2005	4	2	2011	1.98			
AT67	1702	10	1	1713	5.83			
AT68	1013	7	4	2024	3.45			
GII69	2001	5	0	2006	2.49			
GII70	1859	8	0	1867	4.28			
GII71	1870	5	1	1876	2.66			
GII72	2003	7	0	2010	3.48			
GII73	2000	9	3	2012	4.47			
GII74	2034	6	1	2041	2.93	3.15	0.88	0.28
GII75	2007	3	0	2010	1.49			
GII76	1766	5	1	1772	2.82			
GII77	1554	5	0	1559	3.20			
GII79	1864	7	3	1874	3.73			

Clave	Células normales	MN	BE	TOTAL	MCN/1000	X	SD	EE
F195	2000	7	2	2009	3.48			
F196	2004	12	1	2017	5.94			
F197	2005	10	1	2016	4.96			
F198	2000	3	3	2006	1.49	3.12	1.75	0.66
F199	2000	3	0	2003	1.49			
F200	2000	5	5	2010	2.48			
F201	2002	4	1	2007	1.99			
CN49	2016	0	0	2016	0.00			
CN50	2000	2	1	2003	0.99			
CN51	2002	2	1	2005	0.00			
CN52	1784	0	0	1784	0.00			
CN53	2000	1	0	2001	0.49	0.69	0.81	0.27
CN54	1952	5	2	1959	2.55			
CN55	1708	2	3	1713	1.16			
CN56	1990	1	3	1994	0.50			
CN57	2002	1	1	2004	0.49			

MN: Micronúcleo BE: Broken-egg X: Media SD: Desviación estándar

EE: Error estándar

CUADRO 6. Frecuencia de micronúcleos y atipias/1000 células epiteliales orales de individuos expuestos.

CLAV	MN	BE	CR	CL	CC	PIC	BN	ATIPIAS	N° TOTAL DE CÉLULAS	
									NORMA	ANALIZ
P32	2.00	0.00	2.00	744.00	0.00	2.00	0.00	750.00	250	1000
P33	2.00	2.00	0.00	5.00	3.00	3.00	0.00	15.00	985	1000
P34	1.00	2.00	7.00	18.00	4.00	1.00	1.00	34.00	966	1000
P35	0.00	3.00	4.00	4.00	3.00	3.00	0.00	17.00	983	1000
P39	2.00	1.00	2.00	45.00	4.00	19.00	1.00	74.00	926	1000
P40	2.00	1.00	4.00	48.00	14.00	2.00	1.00	72.00	928	1000
P44	5.00	2.00	8.00	0.00	0.00	0.00	1.00	16.00	984	1000
P53	4.00	5.00	7.00	2.00	9.00	0.00	4.00	31.00	969	1000
P54	3.00	18.00	12.00	7.00	7.00	18.00	3.00	68.00	932	1000
X	2.33	3.77	5.11	97.00	4.88	5.33	1.22	119.66	80.33	1000
SD	1.50	5.51	3.72	243.31	4.48	7.54	1.39	237.64	37.64	0.00
EE	0.50	1.83	1.24	81.10	1.49	2.51	0.46	79.21	79.21	0.00
GI41	4.00	0.00	6.00	74.00	11.00	5.00	0.00	100.00	900	1000
GI42	1.94	0.00	9.72	67.12	10.70	2.91	1.94	94.35	931	1028
GI43	0.00	2.59	28.57	174.00	7.79	10.38	0.00	223.37	299	385
GI44	0.00	0.00	25.15	44.23	30.35	1.73	0.00	101.47	1036	1153
GI45	0.00	0.00	19.79	71.87	8.33	3.12	1.04	104.16	860	960
GI48	0.00	0.00	4.00	134.00	11.00	7.00	0.00	156.00	844	1000
X	0.99	0.43	15.54	94.20	13.19	5.02	0.49	129.89	11.66	921
SD	1.66	1.06	10.37	49.17	8.52	3.21	0.82	51.08	60.22	270.76
E.E	0.68	0.43	4.23	20.07	3.47	1.31	0.33	20.85	105.23	110.54
AT59	0.00	0.00	25.77	302.07	22.90	3.57	0.71	355.04	901	1397
AT60	1.53	0.00	15.38	93.85	29.23	13.80	1.53	155.38	549	650
AT61	0.00	1.01	11.08	67.47	11.07	4.02	0.00	94.66	899	993
AT62	0.00	0.00	15.31	63.60	16.48	1.17	0.00	96.58	767	849
AT63	0.00	0.00	21.05	268.42	86.84	2.63	0.00	378.94	236	380
AT64	1.08	0.00	25.03	142.54	31.55	0.00	0.00	200.21	735	919
AT65	0.00	0.00	0.00	87.50	7.29	3.12	1.04	98.95	865	960
AT66	0.00	1.00	10.00	220.00	16.00	4.00	0.00	251.00	749	1000
AT67	0.00	0.00	47.79	84.76	49.59	5.41	0.00	187.55	901	1109
AT68	1.99	0.00	7.97	147.55	15.95	1.99	0.00	175.47	827	1003
X	0.46	0.20	17.94	147.77	28.69	3.97	0.32	199.38	742.90	926.00
SD	0.77	0.42	13.15	86.70	23.80	3.79	0.56	101.87	208.58	269.89
E.E	0.24	0.13	4.15	27.41	7.52	1.20	0.17	32.21	5.95	5.34

CLAV	MN	BE	CR	CL	CC	PIC	BN	ATIPIAS	N° TOTAL DE CÉLULAS	
									NORMA	ANALIZ
GII69	0.00	0.00	16.93	181.27	21.91	0.99	0.00	221.11	782	1004
GII70	0.00	0.00	34.21	48.87	23.46	0.97	0.00	107.52	913	1023
GII71	0.00	0.00	18.59	157.53	13.69	0.00	0.00	189.82	828	1022
GII72	5.52	0.00	1.84	123.38	1.84	0.00	0.00	132.59	472	543
GII73	0.00	0.00	10.96	159.52	24.92	0.00	0.00	195.41	807	1003
GII74	0.00	0.00	4.02	84.50	14.08	2.01	2.01	106.63	444	497
GII75	0.00	0.00	35.71	117.85	42.85	0.00	0.00	196.42	225	280
GII76	1.00	0.00	10.00	164.00	24.00	1.00	0.00	200.00	800	1000
GII77	0.00	0.00	32.82	196.92	47.17	5.12	0.00	282.05	700	975
GII79	0.00	0.00	9.78	213.30	24.46	0.97	0.00	248.53	768	1022
X	0.65	0.00	17.48	144.71	23.84	1.10	0.20	188.01	661.88	836.90
SD	1.74	0.00	12.61	51.10	12.30	1.56	0.63	57.77	228.55	282.13
E.E	0.55	0.00	3.98	16.16	3.89	0.49	0.20	18.27	72.27	89.21
CP195	1.00	0.00	126.00	36.00	58.00	3.00	0.00	224.00	776	1000
CP196	0.93	0.00	102.25	80.67	61.91	9.38	0.00	255.15	794	1066
CP197	0.98	0.00	140.03	33.53	32.54	1.97	0.98	210.05	801	1014
CP198	0.00	0.00	171.59	67.06	34.51	8.87	0.00	282.05	728	1014
CP199	1.75	0.00	124.89	62.44	19.34	2.63	0.00	211.08	397	535
CP200	1.00	0.00	126.00	36.00	58.00	3.00	0.00	224.00	776	1000
CP201	1.00	1.00	97.00	74.00	30.00	1.00	1.00	205.00	795	1000
X	0.95	0.14	126.82	55.67	42.04	4.26	0.28	230.19	723.85	947.00
SD	0.51	0.37	24.75	20.00	16.88	3.39	0.48	28.26	146.18	183.17
E.E	0.19	0.14	9.35	7.56	6.38	1.28	0.18	10.68	55.25	69.23
CN49	0.00	0.00	2.53	64.13	2.53	7.59	0.00	80.16	1090	1185
CN50	0.00	0.99	10.98	67.93	16.98	1.99	0.99	99.90	901	1001
CN51	0.63	0.99	1.99	34.96	0.99	0.99	0.00	39.96	961	1001
CN52	0.00	0.99	6.93	52.52	14.86	12.88	0.99	89.19	917	1009
CN53	0.00	0.00	7.89	102.63	9.64	1.75	0.87	122.80	100	1140
CN54	0.00	3.00	15.00	53.00	15.00	6.00	1.00	93.00	907	1000
CN55	0.00	4.00	5.00	84.00	16.00	3.00	2.00	114.00	886	1000
CN56	0.00	0.00	5.90	18.70	4.92	6.88	0.00	36.41	979	1016
CN57	0.00	0.00	28.70	37.96	25.00	1.85	0.00	93.51	979	1080
X	0.07	1.10	9.44	57.31	11.17	4.77	0.65	85.44	957.77	1048
SD	1.12	1.45	8.27	25.81	7.84	3.91	0.70	29.70	64.02	70.55
E.E	0.07	0.48	2.75	8.60	2.61	1.30	0.23	9.90	21.34	23.51

MN: Micronúcleo **BE:** Broken egg **CR:** Cariorrexis **CL:** Cariolisis **PIC:** Picnosis
CC: Cromatina condensada **BN:** Binucleadas **ANALIZ:** Analizadas **X:** Media
SD: Desviación estándar **EE:** Error estándar

CUADRO 7. Análisis estadístico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana y células epiteliales orales de las individuos expuestos a contaminantes, usando la prueba de " t " de Student.

Grupo experimental	Linfocitos humanos	Células epiteliales
	p	p
Plazuelas	0.0002***	0.0004***
Gasolineros1	0.0083**	0.1190
Agentes de tránsito	<0.0001***	0.1604
Gasolineros2	<0.0001***	0.3339
Fumadores	0.0024**	0.0003***

- * p < 0.05 Diferencia significativa.
- ** p < 0.005 Diferencia muy significativa.
- *** p < 0.0005 Diferencia altamente significativa.

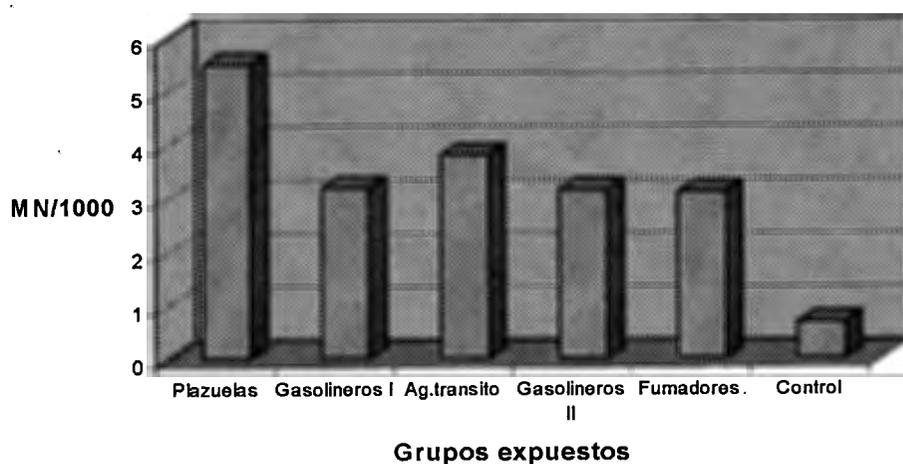


FIGURA 9. Frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de individuos expuestos a contaminantes ambientales.

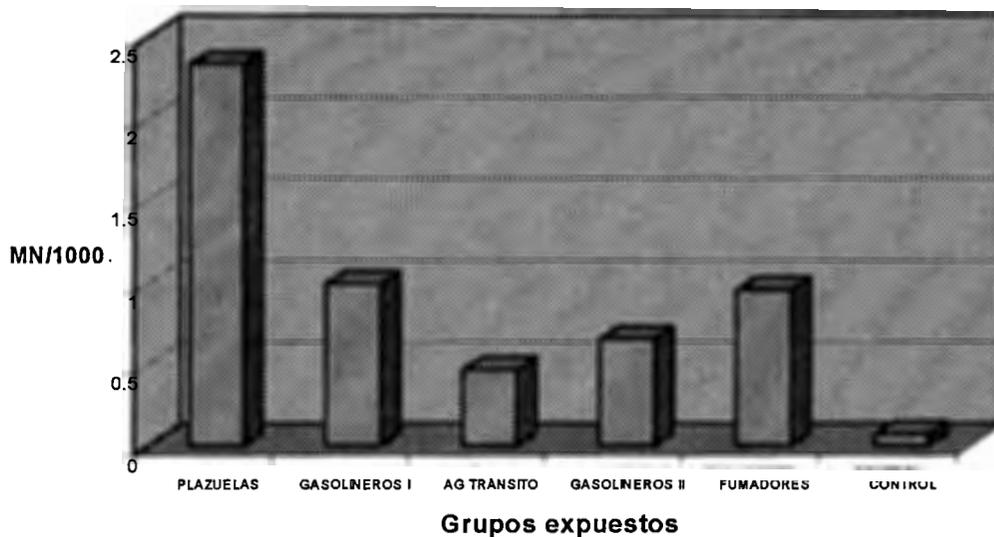


FIGURA 10. Frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos a contaminantes ambientales.

CUADRO 8. Análisis estadístico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana y células epiteliales orales en individuos de acuerdo a los hábitos personales como es fumar-alcohol usando la prueba de U de Mann-Whitney.

Hábitos personales	Linfocitos humanos	Células epiteliales
	p	p
Fumar-alcohol	<0.0002***	0.3242

- * p< 0.05 Diferencia significativa.
- ** p< 0.005 Diferencia muy significativa.
- *** p< 0.0005 Diferencia altamente significativa.

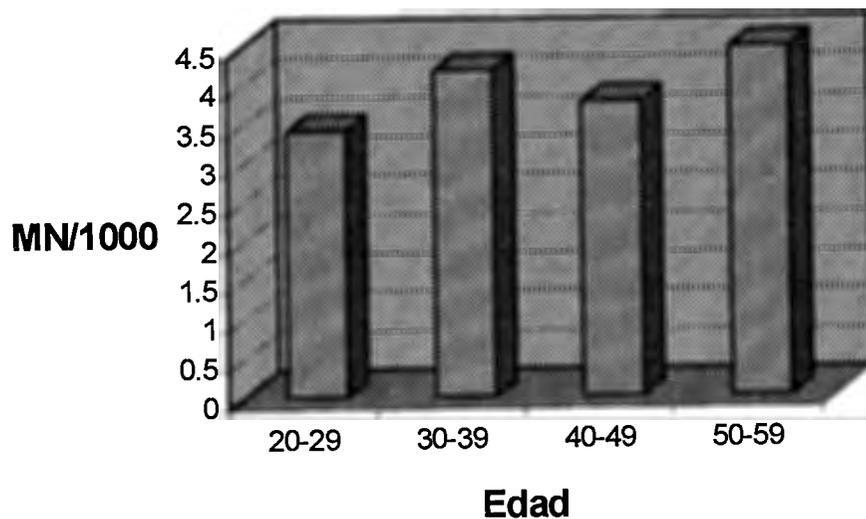


FIGURA 11. Efecto de la edad en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de individuos expuestos a contaminantes ambientales.

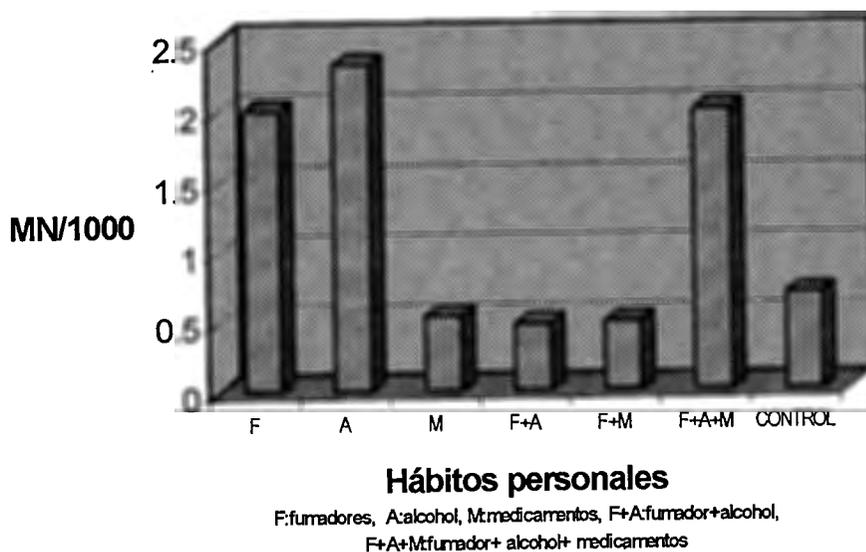


FIGURA 12. Frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de individuos expuestos agrupados por hábitos personales.

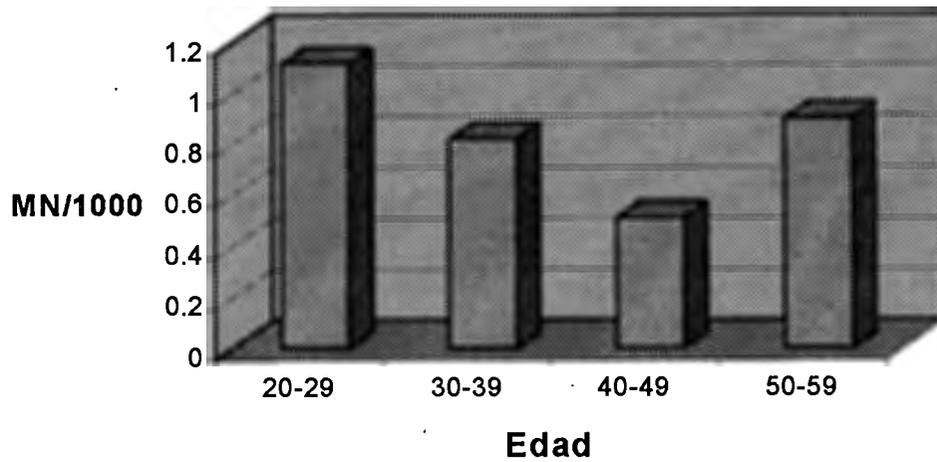


FIGURA 13. Efecto de la edad en la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos a contaminantes ambientales.

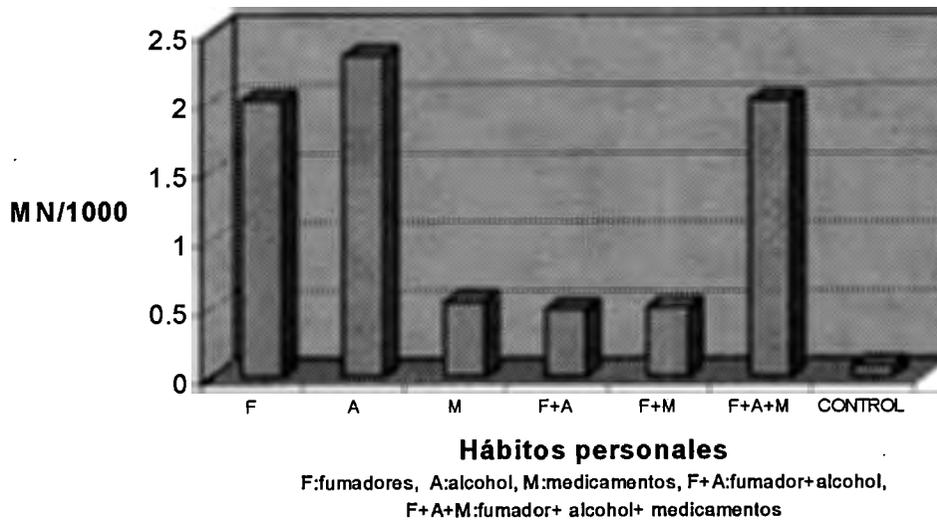
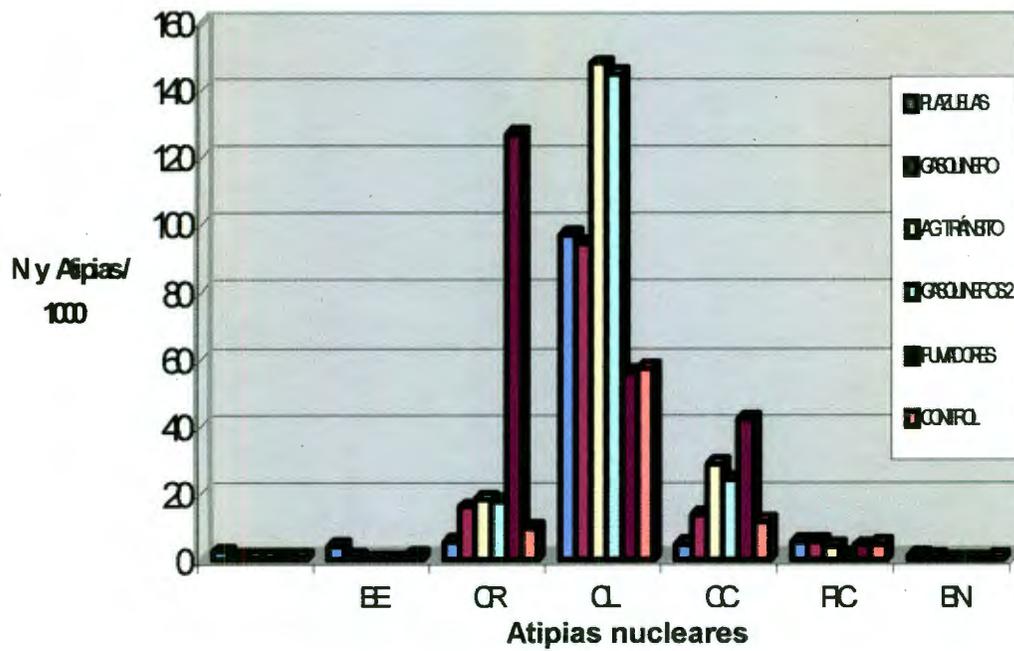


FIGURA 14. Frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales de individuos expuestos agrupados por hábitos personales.



MN:micronúcleo, BE:broken-egg, CR: cariorrexis, CL:cariolisis, CC: cromatina condensada, PIC:picnosis, BN: binucleada

FIGURA 15. Frecuencia de micronúcleos y atipias nucleares en células epiteliales orales de personas expuestas a contaminantes ambientales.

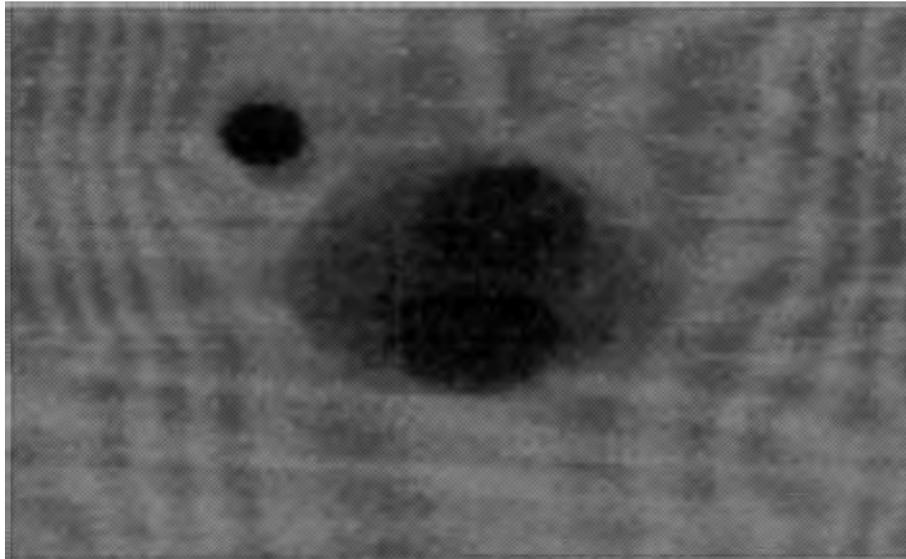


FIGURA 16 . Linfocito binucleado de sangre periférica humana.

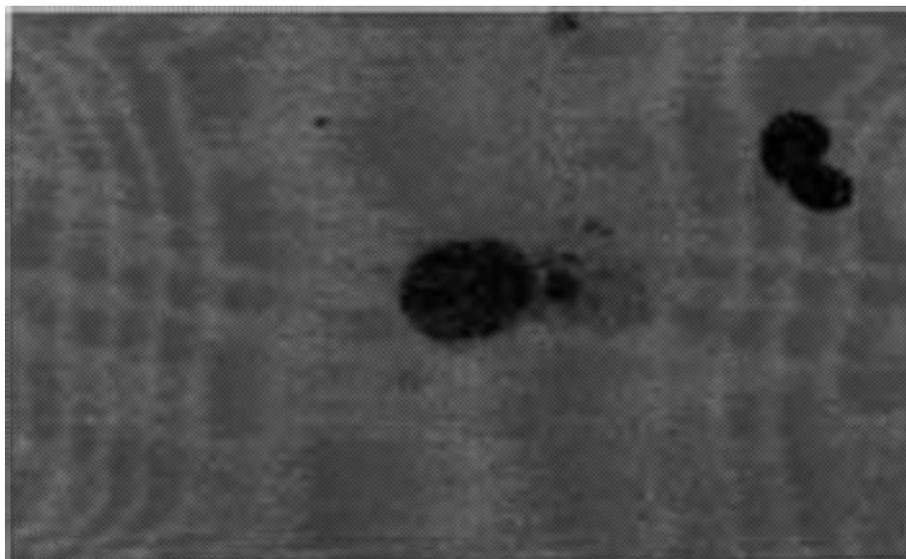


FIGURA 17. Linfocito mononucleado de sangre periférica humana con un micronúcleo.

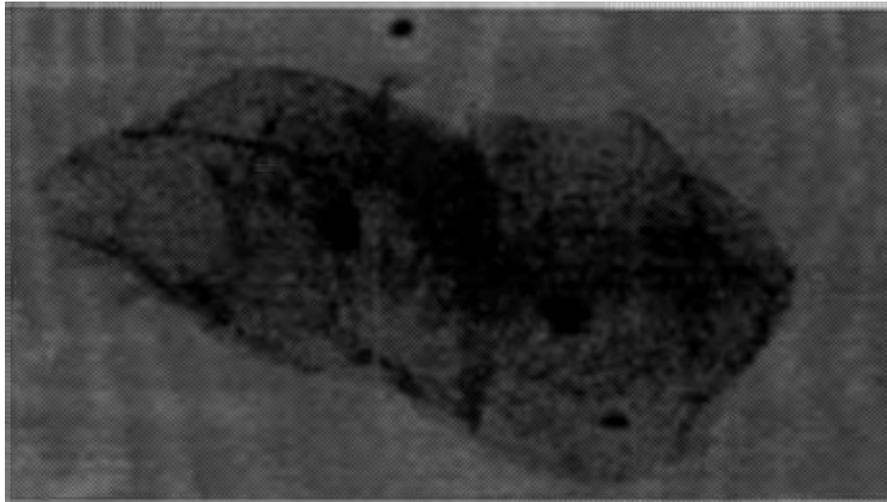


FIGURA 18. Células epiteliales orales normal (izquierda) y anormal "broken-egg" (derecha).

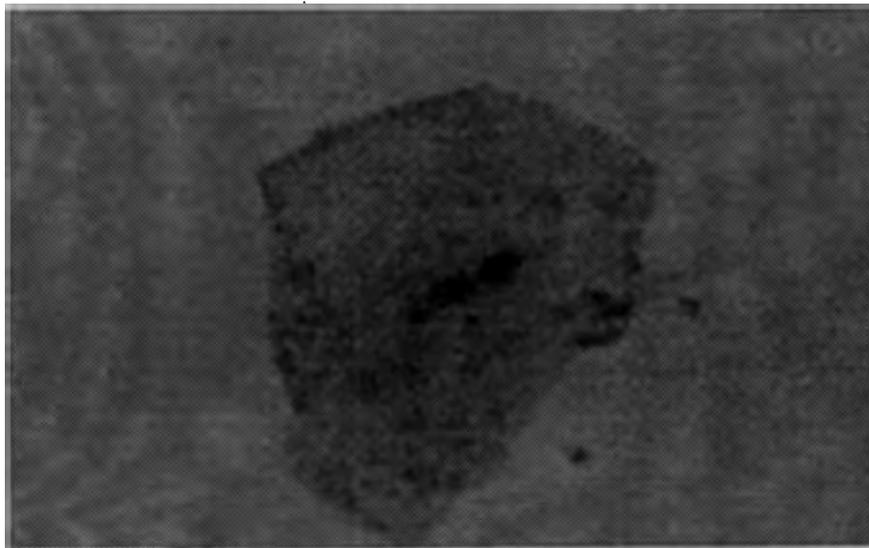


FIGURA 19. Célula epitelial oral con anomalía nuclear (binucleada).

VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los grupos de individuos expuestos a contaminantes presentes tanto en sus ambientes ocupacionales como en los sitios de mayor permanencia en sus actividades diarias presentan elevadas frecuencias de micronúcleos tanto en linfocitos de sangre periférica humana como en células epiteliales orales.

El análisis estadístico de los resultados de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana demostró que existen diferencias significativas en todos los individuos expuestos comparados con el grupo control. En estudios reportados en la literatura se encontró que los gases producidos por la combustión de combustibles y vapores de petróleo (NO_2 , CO_2 , CO , hidrocarburos, benzo(a)pireno, aminas aromáticas, benceno, 1,3 butadieno, etc.) son mutágenos químicos muy potentes, tomando en cuenta la relación entre efectos genotóxicos y el incremento de riesgo para desarrollar cáncer, nuestros resultados sugieren, que los individuos expuestos a esos químicos son grupos en riesgo. La emisión de estos productos tienen propiedades genotóxicas y citotóxicas demostradas por Hadnagy y Seemayer (1989). Esto explica que todos los individuos seleccionados para este estudio presentan diferentes grados de exposición y permanencia en sus actividades diarias, todos están expuestos a las mismas sustancias químicas genotóxicas y citotóxicas, comprobándolo con un aumento en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana. Los resultados obtenidos en el grupo de gasolineros coinciden con el estudio que hicieron Bukvic y *col.*, (1998) los cuales analizaron 22 individuos expuestos a benceno en una gasolinera y demostraron que la exposición a bajas concentraciones de este compuesto induce un aumento en la frecuencia de MN e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos. También coinciden con Hogstedt y *col.*, (1991) quienes detectaron un aumento importante en la frecuencia y tamaño de micronúcleos en linfocitos en trabajadores de gasolineras. Cuando se evaluó la frecuencia de

micronúcleos en muestras de sangre obtenida del grupo de tránsito se observó un promedio y error estándar de 3.81 ± 0.639 respectivamente, estos resultados coinciden con Anwar (1994) el cual realizó un monitoreo a 28 policías de tránsito en el Cairo, Egipto, en el que encontró que tanto el porcentaje de aberraciones cromosómicas (AC), como de ICH fueron significativamente más altos que el grupo control; Zhao y *col.*, (1998) analizaron a 57 policías de tráfico en Lanzhou (China) los resultados obtenidos en las frecuencias de MN e ICH en linfocitos de sangre periférica humana presentaron una diferencia significativa con respecto a los individuos control. Estudios previos en grupos de fumadores cuando evaluaron el daño producido al material genético por el hábito del tabaquismo (Jin y *col.*, 1997) obtuvieron un aumento en la frecuencia de AC y MN comparado con el control, datos similares se encontraron en el grupo de fumadores de este estudio, demostrándose que el humo de tabaco es una de las mezclas más genotóxicas que produce daño al ser humano, apoyando este resultado se tiene información de Barale y *col.*, (1998) los cuales hicieron un análisis que se efectuó sobre 1,650 individuos saludables que viven en Pisa y en dos ciudades pequeñas cercanas, Cascina y Navacchio (Ca-Na), los resultados obtenidos mostraron un aumento de 7.3% ICH cuando consumían de 1 a 10 cigarrillos al día; y el análisis estadístico mostró diferencias significativas en comparación con los no fumadores. La frecuencia de micronúcleos obtenida en linfocitos de sangre periférica de individuos seleccionados en la zona minera, fue de (5.50 ± 0.94) que al compararla con el grupo control (0.69 ± 0.27) presenta una diferencia significativa, estos datos coinciden con los de Anwar, 1991; Shamy, 1995 cuando evaluaron grupos de individuos expuestos a mercurio fulmina y vapores de mercurio respectivamente y obtuvieron un aumento significativo en la frecuencia de AC, MN, ICH y en la mutación del gene de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT).

Con respecto al bioensayo de micronúcleos en células epiteliales solamente se observaron diferencias significativas en los grupos de individuos fumadores y de Plazuelas. En estudios reportados en la literatura se encontró que individuos expuestos a carcinógenos orales conocidos, tales como los que se encuentran en el tabaco, presentaron una elevada frecuencia de micronúcleos en células epiteliales en comparación con el control no expuesto (Fontham y *col.*, 1986; Mandard y *col.*, 1987; Reali y *col.*, 1987; Livingston y *col.*, 1990; Sarto y *col.*, 1990; Sampaio, 1999). Esto explica los resultados obtenidos con las muestras de células del epitelio oral en el grupo de fumadores que se encontró una frecuencia de micronúcleos elevada similar a los resultados obtenidos con los individuos de Plazuelas.

Las diferencias de resultados entre estos dos bioensayos probablemente se deba a que el bioensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana sea una prueba un poco más sensible que la de micronúcleos en células epiteliales. Otra razón pudiera ser que las células epiteliales presentan una vida media más corta, por lo que el bioensayo de micronúcleos en células epiteliales probablemente sólo refleja eventos genotóxicos que ocurrieron en la capa basal, en división en las tres últimas semanas.

Al correlacionar los datos obtenidos de genotoxicidad con los datos de hábitos personales obtenida mediante la aplicación de cuestionarios se consideró como un factor importante la edad donde se observó que el grupo de personas de entre 50 y 59 años presentaron una media superior al resto de los grupos; lo anterior puede ser atribuido al hecho de que las alteraciones se hayan estado acumulando a lo largo del tiempo. En cambio, en las células epiteliales orales el grupo que presentó una frecuencia mayor de micronúcleos fue el de 20 a 29 años. En estudios hechos previos sólo se encontró que los niños son más susceptibles que los adultos (Lakhanisky y *col.*, 1993; Laurent y *col.*, 1993; Klemans y *col.*, 1995).

En cuanto al hábito de fumar e ingerir bebidas alcohólicas se encontró diferencias significativas cuando se analizó el efecto genotóxico en la prueba de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana probablemente esto se deba a la interacción sinérgica entre el consumo simultáneo de alcohol y tabaco observado como un aumento en la frecuencia de micronúcleos y como un riesgo para padecer cáncer oral (Wynder y *col.*, 1957).

La edad, sexo y los hábitos personales han sido denominados como factores confusores cuyos efectos aún no están muy claros. En la literatura se reportan algunos estudios en los que se reporta una relación directa entre factores confusores e inducción de genotoxicidad y otros en los que no hay ninguna relación. En general se ha demostrado que los factores confusores como fumar y el hábito al alcohol, edad y sexo, juegan un papel importante en la determinación de la genotoxicidad. Por ejemplo, algunos autores han reportado una relación directa entre fumar y genotoxicidad (Knudsen y *col.*, 1992; Carbonell y *col.*, 1993; Van Hummelen y *col.*, 1994; Moretti y *col.*, 1996; Azuma y *col.*, 1997; Kalina y *col.*, 1998; Major y *col.*, 1998b; Palus y *col.*, 1998; Pitarque y *col.*, 1999; Viezzer y *col.*, 1999) y otros no encontraron ninguna relación (Meng y *col.*, 1990; Carbonell y *col.*, 1993; Binková y *col.*, 1995; Kourakis y *col.*, 1996; Michalska y *col.*, 1999).

Paralelamente al conteo de micronúcleos se evaluó el daño citotóxico manifestado como la presencia de diferentes atipias nucleares. Al evaluar la gráfica de atipias nucleares se observó que la población de fumadores presentó una elevada frecuencia de cariorrexis y cromatina condensada; los agentes de tránsito y gasolineros II presentaron una mayor frecuencia de cariólisis y cromatina condensada. Las atipias nucleares como núcleos en gemación o Broken-egg, cromatina condensada y cariorrexis son alteraciones asociadas con apoptosis o citotoxicidad que son producto de la agresión que provocan los contaminantes a las células (Tolbert y *col.*, 1992). La condensación de la cromatina nuclear, la cariorrexis y los núcleos en gemación son eventos que no se generan por una

división celular como ocurre con la formación de los micronúcleos, sino más bien, la previene (Goldsworthy y *col.*, 1996). Sin embargo, la apoptosis es estimulada tanto por radiaciones ionizantes como por ejemplo compuestos químicos que se unen al ADN o por desregulación genética también puede actuar como un mecanismo de reconocimiento, eliminando células con daño genético; así, la apoptosis en exceso de los niveles normales, puede ser un indicador de daño genotóxico (Tolbert y *col.*, 1992).

VIII. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos con el bioensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana presentaron diferencias significativas entre todos los grupos expuestos y el control.

- Los resultados obtenidos con el empleo del bioensayo de micronúcleos en células epiteliales orales solo se encontraron diferencias significativas en los grupos de individuos de plazuelas y fumadores.

- La prueba de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana resultó ser más sensible que la prueba de micronúcleos en células epiteliales orales.

- Los resultados de los micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana demuestran que el hábito personal de fumar combinado con el consumo de alcohol contribuye a la inducción de genotoxicidad.

- Algunos de los individuos estudiados además de daño genotóxico en células epiteliales resultaron con daño citotóxico.

Como conclusión general se puede mencionar que en este estudio quedó demostrada la relación que existe entre la presencia de contaminantes ambientales ocupacionales y el posible daño genético en células humanas. Se sabe que las enfermedades más severas se encuentran las genéticas donde dentro de las manifestaciones clínicas más importantes por efecto de genotóxicos sobre células somáticas se encuentra el cáncer, por lo que es de suma importancia dar a conocer este tipo de estudios para que las poblaciones estén informadas sobre los posibles riesgos a la salud generados en ambientes contaminados.

X. BIBLIOGRAFÍA

Albert L. 1997. Introducción a la toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud división de Salud y Ambiente. Organización Panamericana de la Salud, OMS. Gobierno de Estado de México. p. 37-52.

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Res.* 463(2):111-172

Al-Sabti K, Metcalfe C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.* 343:121-135.

Ames B, Magua R, Swirsky G. 1987. Jerarquización de posibles peligros carcinogénicos. *Ciencia.* 236:271.

Anwar WA, Gabal MS. 1991. Cytogenetic study in workers occupationally exposed to mercury fulminate. *Mutagen* 6:189-192.

Anwar WA. 1994. Monitoring of human populations at risk by different cytogenetic end points. *Environ Health Perspect ;*102 Suppl 4:131-4.

Azuma S, Kishino S, Katayama S, Akahori Y, Matsushita H. 1997. Highly sensitive mutation assay for mutagenicity monitoring of indoor air using *Salmonella typhimurium* YG1041 and a microsuspension method. *Mutagen.* 12:373-377

Binková B, Lewtas J, Miskova I, Lenicek J, Sram RJ. 1995. DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogen*. 16:1037-1046.

Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen*. 31(3):228-42

Bukvic N, Bavaro P, Elia G, Cassano F, Fanelli M, Guanti G. 1998. *Mutation Res*. 415:25-33.

Cabrera LG, Rodríguez DMG. 1997. El estado actual del medio ambiente en Querétaro. Talleres gráficos de gobierno del estado. Querétaro, Méx. p. 15-16.

Calderón SM, Espinosa RM. 1998. Efecto de Butilate y de molinate sobre la división de los linfocitos Humanos en cultivos con y sin activación metabólica *in vivo* e *in vitro* por *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 14 (1) 39-47.

Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. 1993. Cytogenetic biomonitoring in a spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagen*. 8:511-517.

Claxton LD, Houk VS, George SE. 1995. Integration of complex mixture toxicity and microbiological analyses for environmental remediation reserch. *Ecotoxicity and human Health* . p. 87-122.

Clayson DB, Grant DL. 1992. The assessment of mutagenicity Health protection branch mutagenicity guidelines. *Environ Mol Mutagen*. 21:15-37.

Cortinas CN, Ostrosky WP, Galván S. 1980. Manual de métodos para la investigación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales. Instituto de investigaciones biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. p. 8-12

Craigmill A. 1982. Genetic toxicology. *Environ toxicol.* 4(2):1-7.

Curtis D. Klaaseen. 1996. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. Ed. MacGraw Hill. (9):269-282.

Das N. 1962. Synthetic capacities of chromosomes fragments correlated with their ability to maintain nuclear material. *J. Cell Biol.* 15:121-130.

Enkerlin HE, Cano CG, Garza CR, Vogel ME. 1997. Ciencia ambiental y desarrollo sustentable. Ed. International Thomson Editores. 4:369-395.

Evans HJ. 1997. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutation Res.* 392:5-10.

Fenech M, Morley A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 147:9-36.

Flores R. 1997 Efectos globales de la contaminación. En: *Introducción a la Toxicología Ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud división de Salud y Ambiente. Organización Panamericana de la Salud, OMS. Gobierno de Estado de México (10):149-173.

Fontham E, Rodríguez E. 1986. Validation of smoking history with the micronucleus test, in: *Mechanism in Tobacco Carcinogenesis*. Hoffman, D., and Harris CC. (Eds.), Cold Spring Harbor, N. York. p.113-119

Frantz CN, Maling HV, 1975. The Quantitative microsomal mutagenesis assay method. *Mutation Res.* 31:365-380.

Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J. 1993. Clinical experience with the micronucleus assay. *J Cell Biochem. Suppl.* 17: 206-212.

Goldsworthy T, Conolly R, Steen R. 1990. Apoptosis and cancer risk assessment. *Mutation Res* 365:71-90.

Grant WF. 1998. Higher Plant Assays for the Detection of Genotoxicity in Air Polluted Environments. *Ecosystem Health* 4: 210-229.

Gurr E. 1965. The rational use of dyes in biology and general staining methods, Leonard Hill, London. p.230-241.

Gurrión RM. 1999. Utilización de la prueba de micronúcleos en células epiteliales como bioindicadores de exposición a carcinógenos ambientales. Tesis. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. p.1-60.

Hadnagy W, Seemayer N. 1989. Genotoxicity of particulate emissions from gasoline-powered engines evaluated by short-term bioassays. *Exp Pathol* 37(1-4): 43-50.

Heindryckx R. 1974. En: *Proceedings of the international symposium on the problems of contamination of man and his environment by mercury and cadmium.* Luxemburgo, 3-5 de julio de 1973. CEC, Luxemburgo. p.135.

Hogstedt B, Holmen A, Karlsson A, Raihle G, Nillius K, Vestlund K. 1991. Gasoline pump mechanics had increased frequencies and size of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mutation Res.* 263:51-55.

Jin YL, Wang HZ, Gu H. 1997. Observation of chromosome aberration and micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes among cigarette smokers. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 18(1):40-2.

Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. 1993. *Basic Histology. Epithelial Tissue*. Appleton & Lange. 4:66-77.

Kalina I, Brezáni P, Gajdosová D, Binková B, Salagovic J, Habalová V, OMracková G, Dobias L, Srám RJ. 1998. Cytogenetic monitoring in coke oven workers. *Mutation Res*. 417:9-17.

Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res*. 442:29-35.

Kato H, Sandberg A. 1968. Chromosome pulverization in human cells with micronuclei *J Natl. Cancer*. 40:165-179.

Klemans W, Vleminckx C, Schriewer L, Joris I, Lijzen N, Maes A, Ottogali M, Pays A, Planard C, Rigaux G, Ros Y, Vande Riviere M, Vandenvelde J, Verschaeve L, Deplaen P, Lakhanisky T. 1995. Cytogenetic biomonitoring of a population of children allegedly exposed to environmental pollutants phase 2: Results of a three-year longitudinal study. *Mutation Res*. 342:147-156

Knudsen LE, Bolsen T, Christensen JM, Erik JJ, Egeskov GJ, Carsten JJ, Lundgren K, Lundsteen C, Pedersen B, Wassermann K, Wihardt P, Christian HW, Zebitz U. 1992. Biomonitoring of genotoxic exposure among stainless steel welders. *Mutation Res*. 279:19-142

- Kourakis A, Mouratidou M, Barbouti A., Dimikiotou M. 1996. Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. *Carcinogen*. 17:99-101.
- Kramer J, Condar E, Thurston G. 1990. DNA synthesis in radiation induced micronuclei studied by bromodesoxyuridin labeling and anti-Brdurd antibodies. *Mutagen*. 5:491-495.
- Kyprianou N. 1990 .Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following adrogen ablation. *Cancer Res*. 50: 3748-3753.
- Lakhanisky TD, Bazzoni P, Jadot I, Joris C, Laurent M, Ottogali A, Pays C, Planard Y, Ros. Vleminckx. 1993. Cytogenetic monitoring of a village population potentially exposed to a low level of environmental pollutants. Phase 1: SCE analysis. *Mutation Res*. 319:317-323.
- Laurent C, Lakhanisky T, Jadot P, Joris I, Ottogali M, Planard C, Bazzoni9 D, Foidart JM, Ros Y. 1993 Increased sister-cromatid exchange frequencies observed in a cohort of inhabitants of a village located at the boundary of an industrial dumping ground: phase I, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*. 2:355-362.
- León J, Guerrero I, Pellicer A. 1988. Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos. *Investigación y ciencia*. 143: 20-32.
- Lijinsky W. 1989. A view of the relations between carcinogenesis and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 14(46):78-84.
- Livingston G, Reed R, Olson B, Lockey J. 1990. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ Mol Mutagen*. 15:136-144.

Ma TH. 1986. Desarrollo y aplicación de bioensayos rápidos y fáciles para mutágenos ambientales. *Investigación*. 16:130-132.

Major J, Jakab MG, Tompa A. 1998. Genotoxicological monitoring of 175 subjects living in the green belts, inner town or near chemical industrial estates in Greater Budapest agglomeration, Hungary. *Mutation Res*. 412:9-16.

Mandard AM, Duigon F, Marnay J. 1987. Analysis of the results of the micronucleus test in patients presenting upper digestive tract cancer and in on-cancerous subjects. *Int.J.Cancer*. 39:442-444.

McKenzie SB. 1991. Leucocitos. En: *Hematología clínica*. Ed. El manual moderno S.A. de C.V. México, DF-Santafé de Bogotá . (4):68-83.

Meng Z, Zhang L. 1990 Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide. *Mutation Res*. 241:15-20.

Mercado CF. 1997). Hidrocarburos poliaromáticos. En: *Introducción a la toxicología ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud división de Salud y Ambiente. Organización Panamericana de la Salud, OMS. Gobierno de Estado de México. (19):313-331.

Michalska J, Motykiewicz G, Pendzich J, Kalinowska E, Midro A, Chorazy M. 1999. Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. *Mutation Res*. 445:139-145.

Moretti M, Villarini M, Scasellati-Sforzolini G, Monarca S, Libraro M, Fatigoni C, Donato F, Leonardis C, Perego L. 1996. Biological monitoring of genotoxic hazard in workers of the rubber industry. *Environ Health Persp*. 104. (suppl 3):543-545.

- Mueller DW. 1992. Environmental Health. London. Harvard. University Press. p. 1-32.
- Obe G, Beck P. 1975. Micronucleus derived premature chromosome condensation human genetic. Mutation Res. 30:143-154.
- Organización Mundial de la Salud. 1978. Criterios de salud ambiental 1. Mercurio. Publicación de la OMS. 362:223-30.
- Organización Mundial de la Salud. 1979. Criterios de salud ambiental 4. Óxidos de Nitrógeno. Publicación de la OMS. 389:3-4.
- Organización Mundial de la Salud. 1983. Criterios de salud ambiental 13. Monóxidos de Carbono. Publicación de la OMS 455. p.9-11,48
- Palus J, Dziubaltowska E, Rydzynski K. 1998. DNA single-strand breaks and DNA repair in the lymphocytes of wooden furniture workers. Mutation Res. 408:91-101.
- Pitarque M, Creus A, Marcos R, Hughes J.A, Anderson D. 1999. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. Mutation Res. 440:195-204.
- Rabbitts TH. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 372:143-279.
- Reali D, Marino F, Carolucci A. 1987. Micronuclei in exfoliated cells and urine mutagenicity in smokers. Mutation Res. 192: 145-149.
- Rieger R, Michaelis A, Green M. 1968. A Glossary of Genetics and Cytogenetics, 3ed, Allen and Unwin, London. p. 507.

Rivero O, Ponciano G, Fourtoul T. 1993. Antecedentes de la contaminación atmosférica. Pulido M (eds): "Contaminación Atmosférica y Enfermedades respiratorias". Fondo de Cultura Económica. México, D.F. p. 46-57.

Rooney, DE and Czepulkowski. 1992. Human cytogenetics. A practical Approach. Vol II. Oxford University Press. New York, USA.

Ross M, Romrell L, Gordon K. 1997. Histología, texto y atlas color. Aparato digestivo 15: cavidad oral y faringe. 15: 402-404.

Sampaio Hd, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. 1999. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Acta Cytol. 43(2):117-20

Sarto F, Finotto L, Giancomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis A. 1990. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. Mutagen. 2:11-17.

Shamy MY, El-Gazzar RM, Taleb AN, Christie NT, Said KF. 1995. Somatic cell mutation in workers occupationally exposed to mercury vapors. J. Environ Pathol Toxicol Oncol. 14:165-171

Schmith W. 1975. The micronucleus test. Mutation Res. 31:9-15.

Stich H, Curtis J, Parida B. 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers, Int.J. Cancer. 30:553-559.

Stich H, San R, Rosin M. 1983 Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells, Ann N.Y. Acad. Sci., 407, 93-105.

Tolbert P, Shy C, Allen J. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Res.* 271:69-77.

U.S. Environmental Protection Agency. 1996. 1994 Toxics Release Inventory Public Data Release: Executive Summary, Washington , DC, EPA-745-S-96-001.

Van Hummelen P, Severi M, Pauwels W, Roosels D, Veulemans H, Kirsch-Volders M. 1994. Cytogenetic analysis of lymphocytes from fiber-glass-reinforced plastic workers occupationally exposed to Styrene. *Mutation Res.* 310:157-165.

Vega S. 1985. Carcinogénesis química. En: Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. *Toxicología IV.* OPS/OMS. México, DF. p. 2-15

Vega S. 1985a. Evaluación del riesgo en la exposición a sustancias químicas. En: Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. *Toxicología VI.* OPS/OMS. México, DF. p. 2 -17

Vega S. 1985b. Genotoxicidad y daño al sistema reproductor. En: Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. *Toxicología V.* OPS/OMS. México, DF. p. 3-4.

Viezzler C, Norppa H., Clonfero E, Gabbani G, Mastrangelo G, Hirvonen A, Celotti L. 1999. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphism on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers. *Mutation Res.* 431:259-269.

Vogel ME, Alva UR. 1997. Contaminación atmosférica. En: *Ciencia ambiental y desarrollo sustentable.* 17:385-399.

Wyllie A, Soku W, Marafante E, Okada S. Cell death. 1981. A new classification separating apoptosis from necrosis. In: Cell death in Biology and Pathology Chapman and Hall. London. p. 1-34.

Wynder E, Bross I, Feldman R. 1957. A study of the etiological factors in cancer of the mounth. Cancer. 10:1300-1323.

Zhao X, Niu J, Wang Y, Yan C, Wang X, Wang J. 1998. Genotoxicity and chronic health effects of automobile exhaust: a study on the traffic policemen in the city of Lanzhou. Mutation Res. 415(3):185-190.

INDICE DE FIGURAS

Al-Sabti K, Metcalfe C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Res. 343:121-135.

Enkerlin HE, Cano CG, Garza CR, Vogel ME. Ciencia ambiental y desarrollo sustentable. 1997. Ed. International Thomson Editores. (4)369-395.

Tolbert P, Shy C, Allen J. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation Res. 271:69-77.

INDICE DE CUADROS

Fuente: SEDESOL/INE. *México: informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1991-1992*, México, 1993.

Fuente: Junge CE. 1977 Basic considerations about trace constituents in the atmosphere as related to the fate of global pollutants. Adv Environ Sci Techno 8:17-25.

Al-Sabti K, Metcalfe C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Res. 343:121-135.

ANEXO I

CUESTIONARIO

Usted esta participando en una investigación la cual se realiza en el centro Académica sobre contaminación Ambiental de la Facultad de Química de la UAQ. Los datos obtenidos en este cuestionario y resultados serán confidenciales.

Por favor escriba su respuesta en el espacio que se le asigna.

1.- ¿Cuál es su nombre completo ?

Apellido Paterno	Materno	Nombre(s)
------------------	---------	-----------

2.- ¿Cuál es su fecha de nacimiento?

Día	Mes	Año
-----	-----	-----

3.- Lugar de nacimiento

4.- ¿ A qué se dedica?

5.- ¿ Cuánto tiempo tiene desempeñando ese trabajo?

5ª. ¿ Cuántas horas al día?

6.- ¿ Usa algún tipo de protección?

7.- ¿Cuál es su dirección actual ?

8.- ¿ Cuantos años hace que vive en esa dirección ?

9.- Alguna vez ha vivido en otra dirección que no sea la actual?

9a.- Anote por favor la dirección?

9b.- ¿ Cuantos años vivió en esa dirección ?

10.- ¿ Cuantas personas viven en su casa ?
_____ Personas

11.- ¿ Qué tipo de estufa tiene para cocinar en su casa ?
() De gas () Eléctrica () Otra favor de especificar

12.- ¿ Cómo mantiene el piloto de su estufa?
() Constantemente prendido () Apagado () Variable

13.- ¿ Cuenta con calentador de agua (boyler)?
() Si () No

14.- Usted ha fumado alguna vez en su vida ?
() Si, ¿Cuántos cigarros al día? _____ () No

15.- ¿ Acostumbra ingerir bebidas alcohólicas ?
() Si, ¿Con qué frecuencia? _____ () No, pase a la pregunta 16

15a.- ¿ Qué tipo de bebida ingiere ?

Las preguntas que siguen están relacionadas con su salud.

16.- En las ultimas dos semana, ¿ Cuántos días se quedó en casa por haber estado enfermo(a)?

1-2 días

3-4 días

5 ó más días

Ninguno

17.- ¿ Le han diagnosticado alguna de las siguientes enfermedades?

Bronquitis Neumonía Asma Rinitis alérgica

Eccema (alergia de contacto)

Otra alergia descríbala _____

18.- Ha presentado alguna vez infección o dolor en la garganta?

Si

No

19.-¿Presenta continuamente dolor de cabeza?

Si

No

20.- ¿ Actualmente toma algún medicamento ?

No

Si.

¿ Qué medicamento y desde cuando lo toma? _____