

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN ESTUDIANTES
POTENCIALMENTE EXPUESTOS A COMPUESTOS ORGÁNICOS
PERSISTENTES EN TEXCALAC

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

Miriam Acosta Tlapalamatl

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. Edelmira García Nieto

TUTORES:

Dra. Libertad Juárez Santacruz

Dra. Claudia Irene Calvario Rivera



Ixtacuixtla, Tlax, Enero de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
 CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
 MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
 Publicación: Mayo 2016
 Revisión: 9001:2015 01

**MIRIAM ACOSTA TLAPALAMATL
 CANDIDATO A MCSA
 PRESENTE**

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de titulación ha revisado el trabajo de investigación titulado: **"Evaluación genotóxica en estudiantes potencialmente expuestos a compuestos orgánicos persistentes en Texcalac"**, realizado bajo la dirección de la Dra. Edelmira García Nieto. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

MSP. Patricia Limón Huitrón

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dra. Arely Anaya Hernández

Dra. Libertad Juárez Santacruz

Dra. Edelmira García Nieto

Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

Dra. Claudia Irene Calvario Rivera

Chavero

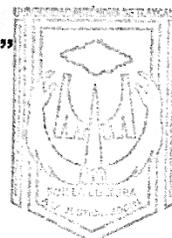
[Handwritten signatures on lines]

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
 Ixtacuixtla, Tlax., 22 de enero de 2018

[Handwritten signature]

MSP. Patricia Limón Huitrón
 COORDINADORA DE LA MCSA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
 EN GENÉTICA Y AMBIENTE
 MAESTRIA EN CIENCIAS
 EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c.c.p. Expediente



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y contó con el financiamiento otorgado por:

PRODEP UATLX-PTC-127

No. de proyecto DSA/103.5/16/10475

CONACYT INFRA-2015

No. de proyecto 255632

AGRADECIMIENTOS

A Instituciones

*Al Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad
Autónoma de Tlaxcala*

*A la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de
Ciencias de la Vida (DICIVA)*

Al Laboratorio de análisis clínicos La Paz

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por la beca otorgada (No. de becario: 584880).*

A Personas

En las siguientes líneas me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. Edelmina García Nieto mi más amplio y sincero agradecimiento por confiar en mi y concederme la posibilidad de realizar este trabajo, por su paciencia, orientación, seguimiento y apoyo para la culminación del mismo. Cuya experiencia, sabiduría y personalidad han sido fuente importante de motivación durante este tiempo.

A la Dra. Libertad Juárez Santaacruz un especial agradecimiento por su valiosa crítica, apoyo y seguimiento a este trabajo, por compartir sus conocimientos, por su gran paciencia y ánimo.

A la Dra. Claudia Irene Calvario Rivera por su disponibilidad y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Rogelio Costilla Salazar de la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida (DICIVA), por su valioso apoyo en el proceso de extracción y cuantificación de los COP.

A mis sinodales MScP. Patricia Limón Huitrón, Dra. Alba Mónica Montiel González, Dra. Arely Anaya Hernández, Dr. Héctor Santos Luna Zendejas, quienes me apoyaron con sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A mi familia

A mis padres José Luis y Juana por todo el amor incondicional y el apoyo brindado a lo largo de mi vida, los amo.

A mis hermanos y cuñados Eugenia y Amado, Alejandro y Mabel, por todo su apoyo y cariño.

A mis sobrinos Luis Alejandro, Jessica, Mariam, Jocelyn, Marlene y Janet, por llenar mi vida de grandes momentos

A mis compañeros y amigos

Por haber hecho de mi estancia en la maestría un trayecto de grandes vivencias e inolvidables recuerdos, especialmente a Sinai Lóvez Ortiz, por su apoyo en la toma y procesamiento de muestras, por compartir incontables horas de trabajo, así como buenos y malos momentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Los compuestos orgánicos en el ambiente	1
I.1.1 Compuestos orgánicos persistentes (COP)	2
I.1.2 Comportamiento ambiental de los COP	9
I.1.3 Exposición humana a los COP	11
I.1.4 Efectos asociados a los COP	13
I.1.4.1 Inmunosupresión	14
I.1.4.2 Disrupción endocrina	16
I.1.4.3 Cáncer	20
I.1.5 Mecanismos de toxicidad de los bifenilos policlorados (BPC)	22
I.1.5.1 Dependientes del receptor aril hidrocarburo	22
I.1.5.2 No dependientes del receptor aril hidrocarburo	25
I.2 Evaluación de riesgo potencial	28
I.3 Biomarcadores de exposición	31
I.3.1 Cuantificación de compuestos orgánicos persistentes en plasma sanguíneo	32
I.4 Biomarcadores de efecto	33
I.4.1 Análisis clínicos	34
I.4.2 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis	38
I.4.3 Ensayo cometa	41
II. ANTECEDENTES	44
II.1 Contaminación con compuestos orgánicos persistentes en Tlaxcala	44
II.2 Genotoxicidad por exposición a los COP	45
III. JUSTIFICACIÓN	49
IV. OBJETIVOS	50

IV.1 Objetivo general.....	50
IV.2 Objetivos específicos.....	50
V. HIPÓTESIS.....	51
VI. METODOLOGÍA.....	52
VI.1 Zonas de estudio.....	52
VI.1.1 Zona de probable riesgo.....	53
VI.1.2 Zona de bajo riesgo.....	54
VI.1.3 Selección de la población.....	55
VI.1.4 Toma de muestra biológica.....	55
VI.2 Cuantificación de compuestos orgánicos persistentes por CGEM.....	56
VI.2.1 Separación de plasma.....	56
VI.2.2 Proceso de extracción con solventes orgánicos.....	56
VI.2.2 Análisis cromatográfico.....	57
VI.3 Química sanguínea parcial y citometría hemática.....	57
VI.3.1 Diferencial de leucocitos.....	58
VI.3.1.1 Recuento diferencial de leucocitos.....	58
VI.4 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis.....	60
VI.4.1 Siembra de las muestras de sangre.....	60
VI.4.2 Bloqueo de citocinesis.....	60
VI.4.3 Fijación y obtención de linfocitos.....	60
VI.4.4 Preparación y tinción de laminillas.....	61
VI.4.5 Análisis microscópico de anomalías nucleares.....	61
VI.5 Ensayo cometa en sangre total.....	64
VI.5.1 Preparación de laminillas con agarosa.....	64
VI.5.2 Montaje de la muestra de sangre sobre las laminillas.....	64
VI.5.3 Desenrollamiento y electroforesis.....	65
VI.5.4 Análisis microscópico de las moléculas de ADN.....	65
VI.6 Análisis estadístico.....	66
VII. RESULTADOS.....	67
VII.1 Caracterización de la población de estudio.....	67
VII.2 Química sanguínea parcial y citometría hemática.....	70

VII.3 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis.....	76
VII.4 Ensayo cometa.....	80
VII.5 Cuantificación de compuestos orgánicos persistentes por CGEM.....	81
VIII. DISCUSIÓN.....	92
IX. CONCLUSIÓN.....	100
X. LITERATURA CITADA.....	101
XI. ANEXOS.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunos COP (Modificado de Ashraf, 2017).	3
Figura 2. Proceso de transporte de los COP (Modificado de Wania y Mackay, 1996).	10
Figura 3. Mecanismo de toxicidad de los BPC similares a dioxina (Modificado de Murray et al., 2014).	25
Figura 4. Biomarcadores de daño al ADN, evaluados mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis enfoque citoma (Modificado de Fenech, 2007).	40
Figura 5. Mapa de las zonas industriales (Fuente propia, elaborado con QGIS versión 2.18.15).	52
Figura 6. Mapa de la comunidad de Santa María Texcalac (Fuente propia, elaborado con QGIS versión 2.18.15).	53
Figura 7. Mapa de la zona de bajo riesgo (Fuente propia, elaborado con QGIS versión 2.18.15).	54
Figura 8. Células analizadas en el diferencial de leucocitos. a) Neutrófilo segmentado, b) Neutrófilo en banda, c) Linfocito, d) Monocito, e) Eosinófilo y f) Basófilo. (Fuente propia).	59
Figura 9. Células y anormalidades nucleares evaluadas en el ensayo de micronúcleos. a) célula mononucleada, b) célula binucleada, c) célula trinucleada, d) célula tetranucleada, e) célula en necrosis, f) célula en apoptosis, g) célula binucleada con un micronúcleo, h) célula con núcleo lobulado, i) célula con puente de cromatina, j) y k) células con núcleo lobulado y puente de cromatina (Fuente propia).	64
Figura 10. Clasificación de las moléculas de ADN de células mononucleares en el ensayo cometa. Los números indican la clase de daño que representan (Fuente propia).	66

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Consumo de sustancias psicoactivas de ambos grupos de estudio. ...	68
Gráfica 2. Comparación de parámetros sanguíneos entre mujeres del grupo expuesto y el grupo de referencia.	71
Gráfica 3. Comparación de parámetros sanguíneos entre hombres del grupo expuesto y el grupo de referencia.	72
Gráfica 4. Comparación de parámetros citométricos sanguíneos entre mujeres del grupo expuesto y el grupo de referencia.	73
Gráfica 5. Comparación de parámetros citométricos sanguíneos entre hombres del grupo expuesto y el grupo de referencia.	74
Gráfica 6. Frecuencia de división nuclear e índice de división nuclear en el grupo expuesto y el grupo de referencia.	77
Gráfica 7. Comparación de la citotoxicidad entre el grupo expuesto y de referencia.	78
Gráfica 8. Genotoxicidad del grupo expuesto y de referencia.	79
Gráfica 9. Frecuencia de moléculas de ADN por categoría de daño e Índice de daño por ensayo cometa (DICA) en individuos de Texcalac.	80
Gráfica 10. Concentración de los COP en individuos de los grupos expuesto y de referencia.	82
Gráfica 11. Comparación de la frecuencia de anomalías nucleares y la presencia de COP en la población total de estudio.	83
Gráfica 12. Regresión lineal entre la suma de COP y las variables de genotoxicidad de ambas poblaciones de estudio.	87
Gráfica 13. Regresión lineal entre el heptacloro epóxido y las variables de genotoxicidad de ambas poblaciones de estudio.	88
Gráfica 14. Regresión lineal entre COP y genotoxicidad en el grupo expuesto.	90
Gráfica 15. Regresión lineal entre COP y núcleos lobulados en el grupo expuesto.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Parámetros antropométricos de la población de estudio	67
Tabla II. Porcentaje de la población asociada a fuentes de contaminación	68
Tabla III. Hábitos domésticos de ambos grupos de estudio (%)	68
Tabla IV. Consumo alimentario por grupo de alimentos de ambas poblaciones de estudio.....	69
Tabla V. Comparación de los diferenciales de fórmula blanca entre el grupo expuesto y el grupo de referencia.	75
Tabla VI. Correlación de Pearson entre los COP y las variables de citotoxicidad y genotoxicidad de ambos grupos de estudio	86
Tabla VII. Correlación de Person entre los COP y las variables de citotoxicidad y genotoxicidad del grupo expuesto	89

RESUMEN

La comunidad de Santa María Texcalac, en el estado de Tlaxcala, México, se encuentra impactada tanto por las descargas en el río Texcalac provenientes de industrias de diversos giros considerados fuentes potenciales de algunos Compuestos Orgánicos Persistentes (COP), así como, por el uso de plaguicidas en zonas agrícolas. En este estudio se evaluó el riesgo potencial por exposición a COP mediante la cuantificación de estos compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el análisis de parámetros clínicos y la determinación de daño al ADN mediante el ensayo de micronúcleos en sangre de estudiantes de nivel medio superior de la comunidad de Santa María Texcalac, los cuales se contrastaron con un grupo de referencia de la comunidad de Huiloapan. Los valores obtenidos en la biometría hemática y en la química sanguínea de ambos grupos de estudio estuvieron dentro de los valores normales y no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que, los individuos se encuentran clínicamente sanos. Los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad mostraron un incremento significativo ($p < 0.001$) en la frecuencia de células apoptóticas, así como, en micronúcleos, núcleos lobulados y puentes de cromatina, respectivamente. La concentración de COP en plasma fue similar en ambos grupos, sin embargo, estos compuestos se detectaron en mayor porcentaje en el grupo de Texcalac, de los cuales, el heptacloro epóxido presentó una concentración significativamente superior ($p < 0.05$) respecto al grupo de referencia. Además, se encontró una asociación positiva y significativa entre la suma de COP y la genotoxicidad total. En el grupo de Texcalac el mayor coeficiente de determinación estuvo dado por el 4,4' DDT y el heptacloro epóxido con la variable de núcleos lobulados. El biomonitoreo en población humana es complejo y de difícil evaluación, ya que en algunos casos las rutas y vías de exposición no son evidentes. Este trabajo es el primer estudio en Tlaxcala en términos de evaluación de riesgo en salud humana, en donde se demuestra la presencia de diversos COP.

ABSTRACT

The community of Santa María Texcalac, in the state of Tlaxcala, Mexico, is impacted by both the discharges into the Texcalac River from industries of various turns considered potential sources of some Persistent Organic Pollutants (POPs), as well as, by the use of pesticides in agricultural areas. In this study, the potential risk of exposure to POPs was evaluated by quantifying these compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry, the analysis of clinical parameters and the determination of DNA damage by the micronucleus test in blood of preparatory students from the community of Santa María Texcalac, which were contrasted with a reference group of the community of Huiloapan. The values obtained in the blood count and in the blood chemistry of both study groups were within normal values and did not present statistically significant differences, therefore, the individuals are clinically healthy. The results of cytotoxicity and genotoxicity showed a significant increase ($p < 0.001$) in the frequency of apoptotic cells, as well as in micronuclei, nuclear buds and nucleoplasmic bridges, respectively. The concentration of POPs in plasma was similar in both groups, however, these compounds were detected in a higher percentage in the Texcalac group, of which heptachlor epoxide had a significantly higher concentration ($p < 0.05$) than the reference group. In addition, a positive and significant association was found between the sum of POPs and the total genotoxicity. In the Texcalac group, the highest coefficient of determination was given by the 4,4'-DDT and the heptachlor epoxide with the variable of nuclear buds. Biomonitoring in the human population is complex and difficult to evaluate, since in some cases pathway and route of exposure are not evident. This work is the first study in Tlaxcala in terms of risk assessment in human health, where the presence of several POPs is demonstrated.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Los compuestos orgánicos en el ambiente

Los compuestos orgánicos, son aquellos que contienen en su estructura química al elemento carbono, el cual está unido principalmente a átomos de hidrógeno. Sin embargo, los carbonos también pueden unirse a elementos como: flúor, cloro, bromo, yodo, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, entre otros. Cada ordenamiento atómico diferente corresponde a un compuesto distinto y por lo tanto, posee un conjunto propio de características físicas y químicas. En algunos casos, dichas características les confieren estabilidad química y difícil degradación, convirtiéndolos en agentes tóxicos y como consecuencia generadores de serios problemas de contaminación ambiental (Morrison y Boyd, 1998).

De acuerdo a las características que comparten, estos agentes tóxicos se han agrupado en: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) y Compuestos Orgánicos Persistentes (COP). Estos contaminantes son ubicuos y su introducción en el medio ambiente puede ser natural al originarse en incendios forestales, erupciones volcánicas y fuentes biogénicas (emisiones de plantas, árboles, animales, procesos anaerobios en turberas y pantanos) y por actividades antrópicas, como la combustión incompleta de materiales orgánicos durante actividades industriales, la calefacción doméstica, la generación de energía, la incineración, el refinado de las industrias petroquímicas, las emisiones de vehículos, la generación de productos de uso doméstico y comercial (Puente y Ramarosan, 2006; Haryanto, 2012; Rocha *et al.*, 2017).

Sin embargo, algunos han sido creados con un fin específico, por lo que han sido de gran importancia en procesos industriales, la agricultura y el control de enfermedades endémicas, por ello, su uso ha sido muy diverso y extenso al ser empleados en plaguicidas, pinturas, fluidos dieléctricos, disolventes, adhesivos, plásticos, aromatizantes, repelentes, aerosoles, productos de uso automotor, entre otros (Albert, 1995).

I.1.1 Compuestos orgánicos persistentes (COP)

Los COP presentan estructuras en anillo con una cadena sencilla o ramificada, son compuestos halogenados en su mayoría clorados. Los enlaces carbono-cloro son muy estables a la hidrólisis y a mayor número de estos enlaces, más elevada es la resistencia a la degradación por acción fotolítica o biológica (El-Shadawi, 2010).

Tienen en común cuatro propiedades: 1) persistencia, que es la capacidad de permanecer intactos durante largos periodos en diversas matrices tales como aire, suelo, agua y sedimento; 2) bioacumulación, la capacidad de acumularse en tejidos grasos, debido a su elevado coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) y poco a poco concentrarse (biomagnificarse) a medida que los organismos consumen a otros a lo largo de la cadena alimenticia, alcanzando niveles superiores a las del medio ambiente circundante; 3) semivolatilidad, pueden ser transportados a larga distancia y causar una contaminación peligrosa en lugares muy lejanos de aquellos en donde la sustancia química entró originalmente al medio ambiente, incluso en los casquetes polares del Ártico y Antártico o en islas remotas del Pacífico; 4) toxicidad, tienen el potencial para causar efectos negativos a la salud humana y/o a los ecosistemas (Wahlstrom, 2003; Ashraf *et al.*, 2015).

La combinación de dichas características resulta peligrosa, por lo que a nivel internacional se han implementado acciones para contrarrestarlos. El primer instrumento jurídico internacional vinculante fue el Protocolo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, del Convenio de Ginebra de 1979, adoptado en Aarhus (Dinamarca), en 1998. Basado en este Protocolo, el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), inició la negociación del Convenio de Estocolmo, que se firmó en mayo de 2001 y entró en vigor el 17 de mayo de 2004 (UNEP, 2010; García *et al.*, 2016).

El convenio tiene como objetivo proteger la salud humana y el medio ambiente de los COP, por lo que se prohibió el uso intencional y se restringió el uso de algunos compuestos, se establecieron las medidas a tomar para minimizar las emisiones no

intencionales. Inicialmente se identificaron 12 compuestos (Figura 1) conocidos como la “docena sucia”, estos incluían nueve plaguicidas: aldrín, clordano, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno (HCB), mirex, y toxafeno; dos compuestos generados de forma no intencional las policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD) y los policlorodibenzo-furanos (PCDF); y un químico industrial, los bifenilos policlorados(BPC) (UNEP, 2004; UNEP, 2017a).

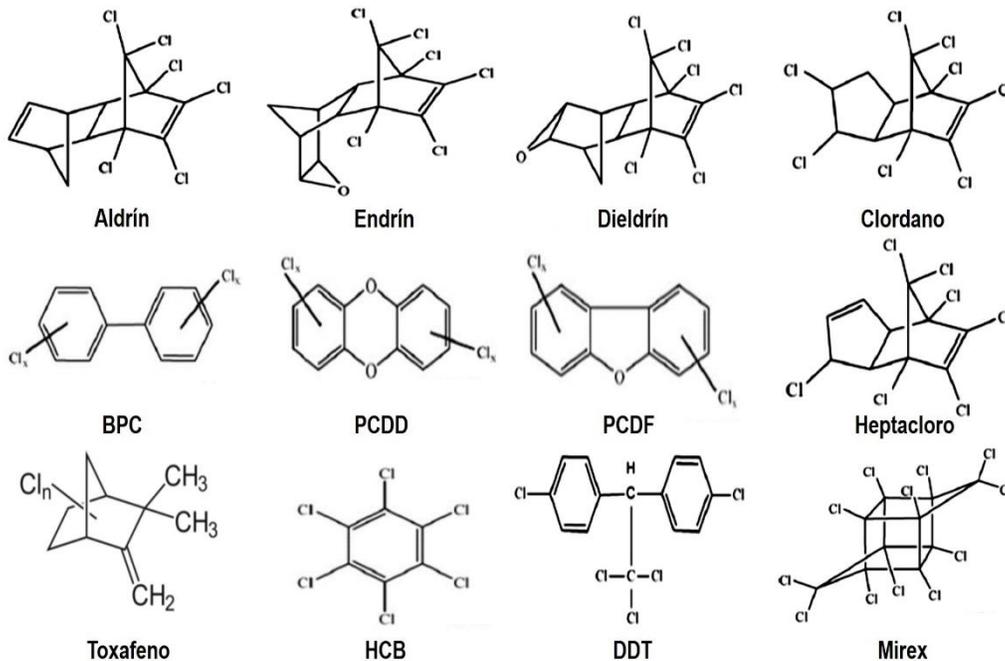


Figura 1. Estructura química de algunos COP (Modificado de Ashraf, 2017).

Actualmente, 181 partes han añadido 16 COP al Convenio de Estocolmo, de los cuales 6 son plaguicidas: alfa hexaclorociclohexano (α -HCH), beta hexaclorociclohexano (β -HCH), clordecona, lindano, endosulfán técnico y sus isómeros relacionados, pentaclorofenol y sus sales y ésteres; los compuestos restantes son químicos industriales: hexabromobifenilo, éter de hexabromodifenilo y éter de heptabromodifenilo, pentaclorobenceno, éter de tetrabromodifenilo y éter de pentabromodifenilo, ácido perfluorooctano y sus sales y fluoruro sulfonilo perfluorooctano, hexabromociclododecano (HBCDD), hexaclorobutadieno (HCBD),

naftalenos policlorados, decabromodifenil éter (c-decaBDE) y parafinas cloradas de cadena corta (PCCC) (UNEP, 2017b).

Los plaguicidas se han producido en grandes cantidades y usado ampliamente a nivel mundial, prácticamente, desde la segunda mitad del siglo XX como principal opción para controlar insectos plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o interfieren con la producción agropecuaria y forestal, lo que ha permitido minimizar las pérdidas de las cosechas en todo el mundo. Su uso aumentó, de manera descontrolada, de casi 280 mil toneladas en 1964 solo para Estados Unidos hasta más de 2.3 millones de toneladas en 2007 a nivel mundial (EPA, 2011).

En México, el uso de plaguicidas comenzó en 1946 con fines sanitarios y agrícolas, teniendo un incremento constante en el mercado de 14 000 ton en 1960 a 60 000 ton en 1986. Entre los principales cultivos en los que se han aplicado se encuentran: maíz, caña, frutales, cítricos, frijol, arroz, trigo, chile y coco. Sin embargo, desde 2002, en el marco del Convenio de Estocolmo y del Plan de Acción Regional de América del Norte, su producción y uso fue prohibido y en algunos casos restringido, a pesar de ello, aún se ha registrado la presencia de residuos en suelos urbanos y agrícolas (Yáñez *et al.*, 2002).

En el territorio mexicano se han identificado 45 sitios con posible contaminación por plaguicidas localizados en 17 estados. Aquéllos con mayor número de sitios registrados son: el Estado de México, Guanajuato, Sinaloa y San Luis Potosí, donde el 27% de los sitios identificados corresponden a vertederos, el 22% a almacenes, el 16% a áreas agrícolas y el 13% a antiguas fábricas (Velasco *et al.*, 2014). Es importante mencionar que los valles Yaqui y Mayo de la región sur de Sonora y la Comarca Lagunera (estados de Coahuila y Durango) son posiblemente las zonas más afectadas, debido al uso histórico de plaguicidas y la producción intensiva actual de cultivos (Rodríguez *et al.*, 2006).

El DDT fue utilizado en campañas de salud para el control de la malaria, donde se aplicó cada seis meses tanto en interiores como en exteriores desde 1957 con una cobertura de 2 g/m² y en actividades agrícolas se utilizaron hasta 1000 ton al año. Las tasas de aplicación en el sureste de México, tanto en las zonas endémicas de paludismo y las zonas agrícolas están entre las más altas del mundo (Díaz-Barriga *et al.*, 2003).

El lindano es el isómero gamma del hexaclorociclohexano y de los 5 isómeros encontrados en la formulación técnica, es el único que posee propiedades insecticidas, como resultado, este isómero es aislado, comercializado y usado extensivamente en varios países (Saradha *et al.*, 2008). Se ha utilizado como plaguicida de amplio espectro para cultivos, semillas, suelos, en preservación de árboles y maderas, tratamiento contra ectoparásitos en ganado y para sarna y piojos en seres humanos. Algunos estudios realizados en México han detectado HCH alfa, beta y gamma en leche de vaca, mantequilla y grasa bovina con posterior transferencia a productos lácteos (Ramos *et al.*, 2011).

La clordecona y el mirex fueron utilizados en las décadas de 1960 y 1970. El mirex fue utilizado como pesticida para el control de las hormigas rojas, así como, en forma de aditivo retardante de la acción del fuego en plásticos, gomas, pinturas, papeles y artículos eléctricos desde 1959 hasta 1972. La clordecona fue utilizada para controlar los insectos que atacaban los cultivos de plátano, los árboles de cítricos, el tabaco y las plantas ornamentales. También se utilizó en productos para el hogar como insecticida en trampas contra hormigas y cucarachas (ATSDR, 1995).

Por su efectiva acción tóxica contra una gran diversidad de organismos, el pentaclorofenol fue originalmente registrado como plaguicida de amplio espectro, el principal uso que se le ha dado es la preservación de la madera y sus productos derivados. En la agricultura ha sido empleado para asegurar la maduración y la apertura de las cápsulas de algodón y como herbicida en cultivos de arroz, piña y caña de azúcar. Como aditivo en pinturas y durante la fermentación de melaza, en

la formulación de jabones, productos de lavandería, medicamentos dérmicos y cosméticos. También se ha utilizado ampliamente como preservativo de hule, textiles y cuero, además en la prevención de la formación de moho en cuartos de refrigeración (ATSDR, 2001).

Otros plaguicidas también utilizados han sido el hexaclorobenceno, un sólido cristalino blanco empleado hasta 1965, en la elaboración de fuegos artificiales, municiones y caucho sintético (ATSDR, 2002). El aldrín se preparó por primera vez en 1948 y se utilizó principalmente contra insectos en el suelo, donde fue eficaz a tasas considerablemente inferiores a las del DDT. El dieldrín resultó como producto de hacer al aldrín menos volátil. Debido a su menor volatilidad, fue muy eficaz contra plagas en cultivos y forrajes, así como en los ectoparásitos de ganado vacuno y ovino (Zitko, 2003).

Por otro lado, aquellos COP que no se encuentran dentro del gupo de los plaguicidas, también han sido ampliamente utilizados en diversos ámbitos, como las PCCC que se producen por cloración de fracciones de parafina de cadena lineal. Son aceites viscosos incoloros o amarillentos densos con presiones de vapor bajas, prácticamente insolubles en agua, alcoholes, glicerol y glicoles, pero son solubles en disolventes clorados, hidrocarburos aromáticos, cetonas, ésteres, éteres, aceites minerales y algunos aceites de corte. Tienen múltiples aplicaciones, pero las principales son: plastificantes para PVC, aditivos para lubricantes de metales que trabajan a alta presión, retardantes de flama y aditivos en pinturas, selladores y adhesivos (OMS, 1996).

Las PCDD y los PCDF forman un grupo de 210 congéneres, 75 y 135 respectivamente. Estas sustancias están constituidas por dos anillos bencénicos, en el caso de las PCDD la unión de estos anillos tiene lugar a través de dos átomos de oxígeno, mientras que en los PCDF se realiza solo con uno, además de un enlace carbono-carbono. En los dos casos estas uniones confieren a la molécula una configuración plana, son muy estables químicamente y presentan diferentes grados

de toxicidad, ejemplos de estos es la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD) reconocida como cancerígeno, mutagénico y teratogénico (McKay, 2002). Estas sustancias no se fabrican industrialmente, se forman de manera espontánea en cantidades traza, en procesos térmicos cuando hay oxígeno, carbón, hidrógeno, cloro, temperaturas entre 200 y 650 °C y bajo condiciones de alcalinidad (PNUMA, 2005).

Dentro de las fuentes naturales se encuentran las erupciones volcánicas, incendios y reacciones fotolíticas, entre las antrópicas están las emisiones de motores a base de gasolina, la incineración de residuos hospitalarios y urbanos, la síntesis de herbicidas y algunos accidentes industriales como el incendio producido en la planta química de Anaversa, en 1991, en Córdoba, Veracruz, donde se dieron las condiciones que favorecieron la formación de dioxinas y furanos (EPA, 2000; Costner 2006; Cruz *et al.*, 2010).

Los BPC son productos químicos industriales usados históricamente como fluidos dieléctricos de condensadores, transformadores y balastos de luces fluorescentes. También se han utilizado en aceites de inmersión de microscopio, papel copia sin carbón, aceites de corte, enfriadores, lubricantes, adhesivos, selladores en empaques, pinturas y como ingrediente en plaguicidas. (Breivik *et al.*, 2002). Todos los BPC tienen en su molécula dos anillos de benceno unidos (bifenilo) con un mínimo de uno y no más de diez átomos de cloro, los cuales, dependiendo de su posición en los enlaces carbono-carbono del bifenilo, se designan como orto, meta y para, que a la vez permite la formación de 209 congéneres (Miller-Pérez *et al.*, 2009).

Los BPC se dividen en dos categorías: 1) Similar a dioxinas, donde se encuentran 12 congéneres, en los cuales las características conformacionales de las moléculas no presentan la rotación del enlace C-C por lo tanto, presentan una estructura planar similar a las dioxinas, lo que les confiere efectos similares a ellas; 2) No similar a

dioxinas, en este se agrupan los 197 congéneres restantes que tienen una estructura y efectos diferentes a las dioxinas (Crinnion, 2011).

En México, el consumo de BPC se inició durante la década de 1940 con la importación de grandes cantidades de equipo eléctrico, principalmente transformadores y capacitores. Del total que se introdujo al país la mayor parte fue producida en los Estados Unidos de América, aunque también se importaron de Europa y Japón, de los BPC utilizados comercialmente, el 50% se aplicó a capacitores, 27% a transformadores, 9% como plastificantes, 6% para fluidos hidráulicos y lubricantes, 1% para aditivos de petróleo y el 7% restante para usos industriales diversos. Se sabe que aproximadamente el 40% de la producción de BPC ha entrado al ambiente, el otro 60% se encuentra distribuido entre residuos y equipos en desuso o almacenados y equipo eléctrico aún en operación (Cortinas, 2001).

En el país se estima, que la cantidad de BPC existente es de ocho mil toneladas, perteneciente en su mayor parte a equipo eléctrico de la Comisión Federal de Electricidad (CFE), de Luz y Fuerza del Centro (LyFC), de Petróleos Mexicanos (Pemex) y del Sistema de Transporte Colectivo METRO y en menor proporción, a equipo eléctrico de la industria de fabricación de transformadores, capacitores, del acero y minera, así como de empresas con subestaciones propias, talleres de reparación de equipo eléctrico y plantas de recuperación y tratamiento de fluidos aislantes (Valle y Cruz, 1997).

La producción de BPC se interrumpió entre 1983 y 1993, pero los BPC siguen presentes en algunos transformadores eléctricos, viejos capacitores, y superficies tratadas con pinturas que contienen BPC, en sellantes de edificios y otras aplicaciones. Además, se han detectado regularmente en los sedimentos de ríos, lagos y canales, y en el tejido adiposo de la biota, aunque a menudo en concentraciones relativamente bajas. El Convenio de Estocolmo requiere la eliminación gradual del uso de BPC para 2025 (UNEP, 2011).

I.1.2 Comportamiento ambiental de los COP

El comportamiento y destino ambiental de los COP están determinados por propiedades fisicoquímicas como el K_{ow} , el coeficiente de partición de carbono orgánico (K_{oc}), el coeficiente de partición octanol-aire (K_{oa}), la constante de la ley de Henry y la presión de vapor. Además de las condiciones del viento, la humedad y la temperatura del ambiente (Buccini, 2003).

Los COP, al momento de ser emitidos como vapores o partículas sólidas (partículas de suelo, sedimento o ceniza) hacia la atmósfera, migran en sintonía con los cambios de temperatura en latitudes medias. Por lo que, las temperaturas cálidas favorecen la evaporación en regiones tropicales y subtropicales, y las temperaturas frías en las latitudes más altas favorecen la deposición en forma húmeda (lluvia o nieve) o seca (polvo) desde la atmósfera hacia la vegetación, el suelo y el agua (Teil *et al.*, 2004).

Diversos factores están involucrados en los procesos de condensar, depositar y acumular los COP en ecosistemas fríos. Las temperaturas frías, favorecen la adsorción de estos compuestos a partículas atmosféricas, que después se depositan en la superficie. De acuerdo a esto, las concentraciones de los COP relativamente móviles en el suelo, agua y otros medios no gaseosos, aumentan en un gradiente desde puntos de liberación cálidos en el ambiente hasta puntos de migración en frío. Lo que conlleva a un gradiente de concentración "invertida", es decir, bajas concentraciones en los trópicos y altas concentraciones en las regiones polares (Dai *et al.*, 2009).

La solubilidad de la mayoría de los COP en el agua es mínima, pero en fluidos orgánicos (aceites, grasas y combustibles líquidos) aumenta considerablemente. Estos compuestos son fácilmente capturados por partículas sólidas, por lo tanto, entre mayor cantidad de partículas sólidas y líquidos orgánicos estén presentes en el agua, mayor será su contenido (Hellou *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos COP como los HCH y los sulfonatos de perfluorooctano, al presentar una solubilidad

relativamente mayor, pueden entrar en aguas superficiales y luego pasar a las corrientes oceánicas y sufrir transporte oceánico global (Yamashita *et al.*, 2008).

La circulación atmosférica y las corrientes oceánicas son dos maneras principales en las que los COP se transportan a nivel mundial. Estos procesos explican la presencia de dichos compuestos en regiones donde no han sido usados, como es el caso del Ártico y la Antártida. Durante el proceso atmosférico, la temperatura juega un papel importante, cuando disminuye los COP se depositan en la superficie terrestre y al aumentar se evaporan en la atmósfera para migrar de nuevo. Este proceso se produce continuamente, por lo que pueden ser transportados y depositados en áreas remotas. Este es el llamado efecto saltamontes (Figura 2) (Wania y Mackay, 1996; Gouin *et al.*, 2004).

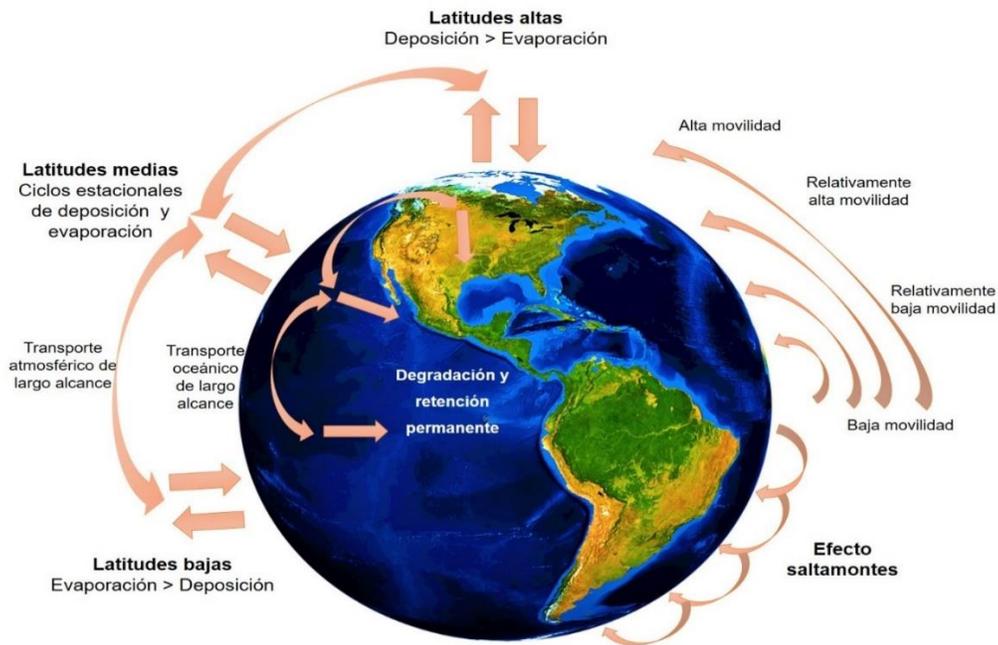


Figura 2. Proceso de transporte de los COP (Modificado de Wania y Mackay, 1996).

Las interacciones entre los suelos y COP en el medio ambiente están relacionadas con la persistencia, la fotodegradación, la degradación química y la degradación microbiana, afectando de esta forma la movilidad, la sorción, la absorción de plantas, la volatilización, la erosión eólica, el escurrimiento y la lixiviación de los mismos (Kim y Smith, 2001; Gavrilesco, 2005; Ashraf, 2017).

En cuanto a la contaminación de la vegetación, esta sucede de dos maneras: 1) por deposición atmosférica y por la interacción de las ceras y grasas propias de las plantas en las hojas; 2) a través de la absorción por la raíz y su transporte a la parte superior de la planta. Existen ciertas características de las plantas como la pilosidad y el contenido de cera de la cutícula, que determinan el grado de acumulación de partículas lipofílicas asociadas con los contaminantes orgánicos (Sojinu, 2012).

I.1.3 Exposición humana a los COP

Los COP debido a su origen, características y comportamiento están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, por lo que pueden entrar en contacto con la población humana de forma ambiental, ocupacional o por ingesta de alimentos contaminados, principalmente a través de vías como: inhalación, ingestión, absorción dérmica, así como por transferencia placentaria y lactancia (Luzardo *et al.*, 2012).

La ingesta de COP por los seres humanos convierte a la dieta en un vector importante, sobre todo a través de los alimentos con alto contenido de grasas, como es el consumo de peces, mariscos, mamíferos marinos, ganado (incluyendo productos lácteos) y huevo, debido a que su metabolismo es lento y se acumulan en el tejido adiposo (Lee *et al.*, 2010; Mamontova, 2017).

Por otra parte, la contaminación de los alimentos por plaguicidas es considerable, puesto que, los plaguicidas organoclorados permanecen en el suelo sin degradación significativa hasta 30 años después de haber sido aplicados. Esa

permanencia favorece la incorporación a la cadena trófica, ya que, puede ser la principal vía de contaminación de productos animales y de la acumulación en frutas y verduras. Además, los residuos de plaguicidas en el suelo representan otra forma de ingesta para la población, especialmente en los niños debido a sus hábitos de jugar en el suelo (Cantu-Soto, *et al.*, 2011; Rychen *et al.*, 2013).

La inhalación y el contacto con la piel también son una vía de exposición a los plaguicidas, incluso, algunos estudios sugieren que la inhalación es más significativa que la ingesta de alimentos, un claro ejemplo, es la aplicación de plaguicidas por los agricultores, que en la mayoría de los casos no utilizan el equipo adecuado para su protección y a pesar de que, la mayoría de estos compuestos no son muy volátiles, pueden ser transportados e inhalados tanto en la fase de vapor como unidos a partículas (Baibergenova *et al.*, 2003; Huang, 2006; Dhananjayan *et al.*, 2012).

La exposición humana a los COP se puede dar desde el período de vida uterina mediante transferencia placentaria. La placenta es un órgano crucial para el suministro de oxígeno y elementos nutricionales de la madre al feto. A pesar de su capacidad para impedir la transferencia de algunos contaminantes, algunos estudios han reportado evidencia de que los COP, incluso los de alto peso molecular, pueden llegar a los fetos (Vizcaino *et al.*, 2011; Vizcaino, 2014).

Jeong *et al.* (2017), reportaron que los COP de menor peso molecular se transportan preferentemente de la sangre materna a la placenta y que los contaminantes de peso molecular mayor tienden a permanecer en los tejidos placentarios, por lo que, se ha sugerido que la placenta puede ser utilizada como una matriz no invasiva para la vigilancia biológica de la exposición prenatal a este tipo de compuestos.

La presencia de COP en la sangre y leche humana es motivo de preocupación a nivel mundial, debido a que la leche materna es el alimento de los bebés durante sus primeros meses de vida y los compuestos tóxicos pueden ser transferidos por

esta vía. La leche humana es, junto con el aire, el compartimento seleccionado por el PNUMA para la vigilancia mundial de los COP (Massart *et al.*, 2005; Castillo-Castañeda *et al.*, 2016).

La exposición a los COP, durante las etapas prenatal y postnatal temprana puede tener efectos importantes en el desarrollo y crecimiento del bebé, predisponiéndolo a enfermedades durante la adolescencia y en la vida adulta (CCA, 2014).

I.1.4 Efectos asociados a los COP

La preocupación pública por la toxicidad de los COP, ha cobrado importancia debido a que se han evidenciado efectos adversos tanto en especies silvestres como en las diferentes etapas de desarrollo de los seres humanos. En consecuencia, estos compuestos cada vez más, son objeto de investigación y atención de salud pública debido a su fuerte relación con el mal funcionamiento de los sistemas endocrino y reproductivo, en problemas de aprendizaje, defectos de nacimiento, trastornos conductuales, neurológicos, inmunológicos, en la intensificación de las infecciones, en la generación y aumento de tumores, por lo que, han sido considerados factores de riesgo sustanciales en la etiología del cáncer humano (Sweetman *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2014).

Se han relacionado con los efectos tóxicos observados en diferentes sistemas del cuerpo humano, incluidos el sistema hepático, endocrino, cardíaco, inmunológico, nervioso, dermatológico, reproductivo, gastrointestinal y respiratorio. Así como, efectos mutagénicos y carcinogénicos, por lo que, también juegan un papel importante en la promoción de tumores (Tharappel *et al.*, 2002).

Los plaguicidas afectan a los receptores involucrados en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. También inducen una disminución en la producción de insulina que afecta a la glucólisis y aumenta el riesgo de diabetes tipo II (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2011). En cuanto al lindano, se ha reportado que sus órganos diana son el sistema nervioso central, el sistema inmunológico, el

hígado, los riñones, el páncreas, los testículos y las membranas mucosas de la nariz (Saradha *et al.*, 2009).

La transferencia de los COP durante la etapa del embarazo puede tener implicaciones para la salud del feto, ya que, al igual que los niños, son más vulnerables que los adultos, debido a que su sistema inmunológico y sus mecanismos de desintoxicación no están completamente desarrollados. Por ello, la exposición intrauterina a estos compuestos conlleva a repercusiones graves en los recién nacidos, efectos adversos en los niños, como el daño al cerebro, pues se ha demostrado que pueden producir disminución del coeficiente intelectual y pueden predisponer a efectos deletéreos en adultos mayores (Vizcaino, 2014; Muhammad, 2017).

I.1.4.1 Inmunosupresión

El sistema inmunológico es un sistema biológico que protege al organismo de enfermedades. Se divide en dos categorías principales: 1) el sistema innato (células asesinas naturales (células NK), eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos) que proporcionan una defensa inmediata contra la infección; y 2) el sistema adaptativo (anticuerpos producidos por células B y respuesta inmediata regulada por citoquinas liberadas por las células T) que proporciona inmunidad duradera a través de la respuesta humoral. El desarrollo de ambos sistemas se origina a partir de la capacidad del cuerpo para producir una respuesta inmune normal posterior a la exposición a un antígeno, la cual, comienza después del nacimiento y continúa durante los primeros años de vida (Busse *et al.*, 2010, Gascon *et al.*, 2013).

Este sistema es altamente sensible a los efectos tóxicos de los COP, pero se sabe poco sobre las consecuencias a largo plazo en la población general expuesta a bajas concentraciones de estos compuestos. Algunos estudios, han planteado preocupaciones sobre los efectos, pues se ha evidenciado que los COP, son capaces de producir inmunosupresión, lo que puede afectar tanto a los componentes humorales como a los mediados por células. Los efectos observados

pueden variar desde una ligera modulación de las respuestas inmunitarias, en ausencia de cualquier evidencia de deterioro de la salud, hasta el desarrollo de una enfermedad inmunológica clínica (Glynn *et al.*, 2008).

Entre las alteraciones reportadas por la exposición accidental, ocupacional o ambiental a las PCDD y los BPC similares a dioxinas, se encuentran los cambios en los subgrupos de linfocitos o la producción de anticuerpos, así como, el desencadenamiento de la activación incontrolada del sistema del complemento lo que puede llevar a atacar las células hospederas (Weisglas-Kuperus *et al.*, 2000).

Las exposiciones durante la vida pre y posnatal temprana a los COP pueden afectar directamente el desarrollo y la función de la inmunidad, lo que podría manifestarse como una disminución de la resistencia del hospedero, una mayor incidencia y gravedad a las enfermedades infecciosas (Levin *et al.*, 2005; Langer, 2009). Se han documentado asociaciones entre exposición y enfermedades infecciosas, especialmente en niños cuyas madres estuvieron expuestas a altos niveles de BPC y PCDD, los cuales presentaron tasas más altas de bronquitis, infecciones respiratorias y otitis media, de las que normalmente se encuentran en poblaciones de referencia (Guo *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha reportado que en bebés expuestos a BPC, PCDD, DDT y sus metabolitos, se presentan alteraciones en los marcadores de la función inmune, como los recuentos de glóbulos blancos y el número de subgrupos de linfocitos durante la infancia (Belles-Isles *et al.*, 2002). Además, se ha encontrado una asociación positiva entre la exposición temprana a BPC y la incidencia de asma o alergias en la etapa infantil (ten Tusscher *et al.*, 2003).

De igual forma, la exposición prenatal a los BPC puede afectar negativamente las respuestas inmunitarias a las vacunaciones infantiles, debido a los cambios en las distribuciones de linfocitos T, B y células NK. Se ha observado una respuesta menor de anticuerpos después de la vacunación contra el tétanos y la difteria, en niños

expuestos a altos niveles de BPC (Heilmann *et al.*, 2006; Hertz-Picciotto *et al.*, 2008), dichos cambios pueden persistir en la edad adulta y presagiar padecimientos como alergias o autoinmunidad (Nagayama *et al.*, 2007).

En general, los efectos de las PCDD y de los BPC similares a dioxinas en el sistema inmune son de señalización dependiente, a través, de un receptor intracelular conocido como Receptor Aril Hidrocarburo (AhR). Muchos de los efectos de estos compuestos sobre el sistema inmune son dependientes de la modulación que el AhR ejerce sobre la vía de señalización del Factor Nuclear potenciador de las cadenas Kappa de las células B activadas (NF- κ B), y la regulación de genes que codifican para factores de crecimiento, citoquinas y factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. La vía de señalización de NF- κ B es compleja y las funciones del sistema inmune dependen de una estrecha regulación de la proliferación celular, el crecimiento, la supervivencia y la apoptosis en muchas situaciones fisiológicas, como el desarrollo ontogénico, respuesta inmune celular y humoral adaptativa, la inflamación y la respuesta inmune innata (Mann *et al.*, 2001).

Por otra parte, a pesar de que los BPC no similares a dioxinas tienen poca o ninguna afinidad por el receptor (AhR), también son capaces de modular respuestas inmunitarias o cambios bioquímicos celulares, pues se ha evidenciado que los BPC no similares a dioxinas, producen una supresión de la fagocitosis, lo cual puede aumentar la susceptibilidad de un individuo a una variedad de enfermedades. Además, si las funciones de los monocitos se deterioran después de que las células maduran en macrófagos de tejido, los efectos adversos pueden extenderse al sistema inmune adaptativo a través de defectos en la presentación del antígeno (Levin *et al.*, 2004).

I.1.4.2 Disrupción endocrina

Los disruptores endocrinos (DE) son agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis,

reproducción, desarrollo y/o el comportamiento (EPA, 1997). Los mecanismos de acción de los DE son muy amplios e implican diferentes vías moleculares. Pueden actuar a través de receptores de membrana, receptores de dopamina, serotonina y norepinefrina, receptor AhR, vías enzimáticas implicadas en la biosíntesis de esteroides, el metabolismo y la neurotransmisión (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Estudios previos han demostrado que los COP presentan potencial capacidad para actuar como DE, puesto que, pueden unirse a diferentes receptores nucleares, desplazando ligandos endógenos e interactuando con vías de señalización y sistemas hormonales, por lo que, pueden afectar el hígado, la tiroides, el páncreas, las gónadas, las suprarrenales y desencadenar diversas patologías (Asp *et al.*, 2010; De Tata, 2014).

Se ha sugerido que los COP pueden provocar efectos adversos en los sistemas reproductivos y de desarrollo, tales como, disfunción ovárica, insuficiencia ovárica prematura e hiperplasia endometrial. Además, algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han proporcionado evidencia de una asociación entre estos contaminantes y la desregulación del metabolismo de la glucosa en sangre y la resistencia a la insulina, que son fundamentales para la patogénesis del síndrome de ovario poliquístico (Hectors *et al.*, 2011; Casals-Casas y Desvergne, 2011).

Las PCDD y los BPC que actúan a través del AhR alteran la expresión de importantes genes relacionados con la adipogénesis, el metabolismo lipídico y los factores inflamatorios (Novelli *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios experimentales sobre plaguicidas organoclorados sin actividades similares a las dioxinas, también han mostrado efectos sobre el peso, lo que indica que podría haber mecanismos perturbadores de la homeostasis de energía independiente del AhR (Polyzoz *et al.*, 2012).

La exposición durante la gestación temprana a BPC, HCB y DDT, puede conducir al desarrollo de la obesidad en etapas posteriores. El HCB se ha asociado con un

crecimiento rápido en los primeros 6 meses de vida, la obesidad en la infancia y la niñez (Tang-Peronard *et al.*, 2014; Casas *et al.*, 2015). De forma similar, la exposición prenatal a congéneres de BPC produce un aumento del Índice de Masa Corporal (IMC) a los 5 y 7 años de edad (Valvi *et al.*, 2013). La exposición prenatal al diclorodifenildicloroetileno (DDE) puede promover el rápido aumento de peso en los primeros 6 meses de vida y el consiguiente sobrepeso a los 14 meses. (Valvi *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha evidenciado que el endrín, el aldrín y el dieldrín inducen una inhibición en la adipogénesis (Moreno-Aliaga y Matsumura, 1999). En cambio, el DDT y sus metabolitos se han asociado con un aumento en la adipogénesis, además de inducir un mayor riesgo de peso corporal alto, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo II y dislipidemia (Howell y Mangum, 2011).

Tras la exposición, las PCDD se concentran en el tejido adiposo y afectan negativamente a muchos órganos, incluido el hígado (Kern *et al.*, 2002). Entre los efectos a este órgano, se ha evidenciado la inducción del síndrome de desgaste cuya característica principal es la gluconeogénesis hepática suprimida (Diani-Moore *et al.*, 2010). Las dioxinas y compuestos relacionados se han asociado con una mayor prevalencia de hígado graso en humanos. La disfunción mitocondrial y las perturbaciones del metabolismo de los ácidos grasos pueden contribuir a la hepatotoxicidad (Lu *et al.*, 2010). Los BPC no similares a dioxinas, pueden ser un segundo golpe en la progresión de la esteatosis inducida por la dieta a la esteatohepatitis, que puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (Lee *et al.*, 2010).

La exposición a los COP, incluidos los BPC, DDT y su metabolito DDE se ha asociado con la alteración de las hormonas tiroideas en varios estudios epidemiológicos humanos (Alvarez-Pedrerol *et al.*, 2009; Golder *et al.*, 2010). La literatura reciente informa que los mecanismos relevantes de la alteración tiroidea por los COP en general son: a) alteración de la actividad general de la glándula tiroidea por interferencia con los receptores de Hormonas Tiroideas (HT); b)

estimulación o inhibición de las funciones enzimáticas que median la captación de yodo de la glándula tiroides en la síntesis de Triyodotironina (T3) y Tiroxina (T4); y c) desplazamiento competitivo de HT en sus proteínas de unión (Boas *et al.*, 2012; Berg *et al.*, 2017).

Los BPC tienen similitud estructural con la T4, por lo que, la exposición prenatal a estos compuestos es de particular interés, debido a que pueden atravesar la placenta e interferir con la producción de la hormona tiroidea, la unión del receptor o el transporte, provocando alteraciones en los niveles de la hormona (Mazdai *et al.*, 2003). Los niveles más bajos de T4 se asocian con el deterioro del desarrollo cerebral (Howdeshell, 2002).

Varios COP en el suero del cordón umbilical han mostrado asociaciones negativas con los niveles de T3 y T4, y al mismo tiempo mostraron asociaciones positivas con los niveles de hormona estimulante de la tiroides (TSH). Algunos estudios experimentales sugieren que los plaguicidas organoclorados pueden estar asociados con hipotiroidismo subclínico en mujeres embarazadas y recién nacidos (Darras, 2008; Kim, *et al.*, 2015).

En cuanto al eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPS), los COP se han relacionado con la interrupción de glucocorticoides y se ha descubierto que los metabolitos de metilsulfonilo de BPC actúan como antagonistas de estas hormonas (Johansson *et al.*, 1998). También pueden alterar la regulación de la secreción y la función de la hormona suprarrenal en diferentes niveles del eje HPS. El lindano se ha asociado con la disminución de la producción de hormonas suprarrenales (Ulleras *et al.*, 2008). Los cambios en este eje HPS pueden conducir a respuestas de estrés alteradas y cambios en las funciones cognitivas. Los niveles elevados de cortisol y aldosterona están asociados con bajo peso al nacer (Martínez-Aguayo *et al.*, 2011). La interrupción de la señalización también puede tener implicaciones para la obesidad, ya que este sistema es fundamental para la diferenciación de los adipocitos (Wilson *et al.*, 2016).

I.1.4.3 Cáncer

El cáncer es uno de los problemas de salud más importantes en el mundo, en el 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes, esta enfermedad comienza con la alteración de una sola célula, que puede ser causada por agentes externos, tanto físicos, químicos y/o biológicos, así como, por factores genéticos heredados (OMS, 2017).

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los COP promueven el crecimiento de células tumorales a través de la alteración de los genes supresores de tumores (Frigo *et al.*, 2004; Rattenborg, 2002). Por otro lado, estudios epidemiológicos han mostrado que dichos compuestos pueden estar asociados con el riesgo de cánceres, como el de mama (Khanjani *et al.*, 2007), próstata (Lim *et al.*, 2017), colon y recto (Brustad *et al.*, 2007), páncreas, útero, hígado, (Botella *et al.*, 2004), piel (melanoma cutáneo) y pulmón (Purdue *et al.*, 2007).

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en el mundo, en 2012 se diagnosticaron casi 1.67 millones de nuevos casos (25% de todos los cánceres), y la mayoría de los casos se presentaron en mujeres de países en desarrollo (Ferlay *et al.*, 2012). De acuerdo a los resultados de numerosos estudios se ha indicado una fuerte asociación entre la exposición a los COP a través de la dieta y su bioacumulación en el tejido adiposo, con la promoción del desarrollo de la obesidad y la influencia en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama (Cabaravdic, 2006).

La población esquimal de Groenlandia y Canadá tuvo una de las tasas más bajas de cáncer de mama en el mundo, hasta 1967, sin embargo, se informó un aumento de 193 casos entre 1969 y 1997 (Nielsen y Hansen 1980, Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2011). Congruentemente, la población esquimal exhibió algunas de las concentraciones séricas más altas de los COP en todo el mundo. Por lo que, se ha propuesto que esta bioacumulación es un resultado directo del alto consumo

dietético de grasas de peces, focas, ballenas, osos polares y aves marinas, lo que llevó a proponer que la alta concentración de COP encontrada en los tejidos estaba relacionada con el reciente aumento del número de casos de cáncer de mama (Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2014).

La mayoría de las asociaciones entre los COP y el riesgo de cáncer de mama se han atribuido a los efectos estrogénicos de determinados COP. Los estrógenos se encargan de regular la deposición del tejido adiposo, la adipogénesis y la diferenciación de los adipocitos. Cualquier desregulación en la producción o distribución de estrógenos podría provocar enfermedades, entre ellas cáncer de mama (Park *et al.*, 2014; Planey *et al.*, 2014). Otro posible mecanismo de acción para los COP y la obesidad en la tumorigénesis mamaria es a través de la acción de la ácido graso sintasa, una enzima responsable de producir ácidos grasos endógenos. Se ha evidenciado que esta enzima es necesaria para la proliferación y los efectos de supervivencia de numerosos cánceres malignos, promoviendo la agresión tumoral (Puig *et al.*, 2009).

Boada *et al.* (2012) plantearon que una mezcla de contaminantes en lugar de contaminantes individuales puede jugar un papel importante en la incidencia del cáncer de mama, tal como lo reportaron, Arrebola *et al.* (2015), quienes encontraron que el 24.8 % de los pacientes con cáncer de mama tenían una combinación de aldrin, DDD y DDE, mientras que ninguna persona sana tenía esta combinación de químicos. En otro estudio, se encontraron niveles significativamente más altos de β y γ -HCH en 135 pacientes con cáncer de mama en la India (Mathur *et al.*, 2002). De la misma manera, la mayoría de los BPC se han asociado significativamente con el riesgo de cáncer de mama (Wilsoe *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha reportado que la exposición en la aplicación y fabricación de plaguicidas organoclorados incrementa el riesgo en el desarrollo del cáncer de próstata en los trabajadores. Además, se ha informado que lo anterior, también es riesgo de cáncer infantil (Carozza *et al.*, 2008), cáncer linfohematopoyético

(Kokouva *et al.*, 2011) y cáncer de pulmón (Wesseling *et al.*, 1999). También, se han encontrado tendencias positivas con la exposición al lindano y al DDT con el desarrollo de linfoma no Hodgking (Brown *et al.*, 1993), el uso de clordano y heptacloro con leucemia (Schinasi *et al.*, 2014) y el clordano y DDT con mieloma múltiple (Presutti *et al.*, 2016).

En cuanto al cáncer colorectal, se sabe que, el p, p'-DDE puede inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), por lo que, las vías mediadas de estrés oxidativo son un mecanismo de toxicidad de este compuesto considerado precursor de dicho cáncer (Song *et al.*, 2014).

I.1.5 Mecanismos de toxicidad de los bifenilos policlorados (BPC)

Las evidencias de los estudios realizados sobre BPC indican que la exposición a estos contaminantes interfiere con el funcionamiento de diferentes órganos y sistemas, por lo que pueden considerarse como un factor de riesgo para la salud humana (Long *et al.*, 2007).

Los mecanismos por los cuales se desarrolla la amplia gama de efectos tóxicos observados por los BPC varía considerablemente entre ellos, esto depende de diferentes factores como su estructura, tipo de BPC (si es una mezcla o congénere), la dosis y la vía de exposición. Además, la toxicidad debida al mecanismo que depende del receptor AhR es diferente a la de aquellos que no dependen de este receptor (Kumar *et al.*, 2014).

I.1.5.1 Dependientes del receptor aril hidrocarburo

El receptor aril hidrocarburo, pertenece a la familia básica de factores de transcripción basic helix loop helix-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) (Hahn, 2002) y se encuentra altamente expresado en placenta, pulmón, corazón, hígado, páncreas; en menor proporción, en cerebro, riñón y músculo esquelético (Tanaka *et al.*, 2005).

Se sabe que la vida media del receptor es de 28 h cuando no hay ligando y de 3 h horas cuando éste se encuentra presente (Andersson, 2003).

En ausencia de ligandos, el AhR se localiza en el citoplasma, unido a un complejo proteico, formado por un dímero de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23 KDa (p23) y una proteína de interacción con AhR parecida a la inmunofilina (AIP), también conocida como XAP2 o Ara9 (Beischlag *et al.*, 2008) (Figura 3). Hsp90 es un componente esencial de la vía de señalización del AhR encargada de dirigir el plegamiento y el mantenimiento adecuados de la conformación de unión al ligando (Soshilov *et al.* 2006). Aunque los otros dos miembros (XAP2 y p23) no son esenciales para la señalización del AhR, juegan un papel importante para la estabilización del complejo citosólico. (Kuzhandaivelu *et al.*, 1996). Además, XAP2 protege al AhR de la ubiquitinación (Morales y Perdew, 2007).

La activación del AhR está dada por la unión de un ligando, como sucede con otros receptores, éste tiene diferentes ligandos entre ellos se encuentran los BPC similares a dioxinas, que por ser compuestos liposolubles, difunden a través de la membrana celular y en el citoplasma se ligan a los dominios del receptor formando el complejo ligando-receptor, que posteriormente es movilizado hacia el núcleo, donde se disocia (Figura 3) (Baba *et al.*, 2005).

Una vez en el núcleo, el AhR, forma un heterodímero con la proteína translocador nuclear del receptor de arilos (ARNT). Este heterodímero AhR/ARNT interacciona con proteínas acetil transferasas de histonas y factores remodeladores de cromatina, lo que provoca la unión del complejo AhR/ARNT en una secuencia de ADN consenso (GCGTGA) conocida como elemento de respuesta a xenobióticos o elementos de respuesta a dioxinas (XRE, DRE) (Figura 3). Esta secuencia está localizada aproximadamente a 1 Kb corriente arriba de sus genes diana. Dentro de estos genes se incluyen aquéllos que codifican enzimas de la fase I del metabolismo de xenobióticos, tales como, citocromos P450 (CYP450). Los genes de la fase I,

regulados por el AhR/ARNT, sólo incluyen a los miembros de la familia CYP1 (CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1) (Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005).

El incremento de la actividad de CYP1, provoca la generación de metabolitos tóxicos, formados a partir de la monooxigenación de los BPC similares a dioxinas, que conducen a la formación de metabolitos hidroxilados, de los cuales, existen 837 posibles productos monohidroxilados (Rayne y Forest, 2010). Sin embargo, pueden someterse a una segunda hidroxilación, produciendo un derivado de BPC dihidroxilado, ya sea como catecol (grupos hidroxilo en la configuración orto) o como hidroquinona (grupos hidroxilo en la configuración para) (McLean *et al.*, 1996). Estos productos pueden ser oxidados por peroxidasas y prostaglandina sintasa, dando lugar a la formación de BPC electrófilos altamente reactivos (Amaro *et al.*, 1996; Wangpradit *et al.* 2009).

Los productos intermedios, así como, los óxidos de areno y las quinonas, son probablemente los más relevantes para la carcinogénesis inducida por BPC, ya que, pueden considerarse intermediarios genotóxicos de acción directa. Algunos estudios han indicado que un óxido de areno intermedio y/o una quinona es la última especie de unión al ADN, y que la guanina es el principal sitio objetivo en el ADN. Además, las BPC quinonas también se unen a proteínas celulares. No obstante, todos los metabolitos de BPC electrófilos con reactividad química elevada deben considerarse como probables iniciadores de cáncer (Amaro *et al.*, 1996; Bender *et al.*, 2006).

Además, los BPC dihidroxilados y sus BPC quinonas correspondientes pueden someterse a ciclos redox, generando ERO, que se consideran activos en la iniciación, promoción y progresión del cáncer. Las mutaciones inducidas por estas reacciones pueden conducir a la activación de oncogenes o la inhibición de los genes supresores de tumores, contribuyendo así al potencial carcinogénico de los BPC (Oakley *et al.*, 1996). La formación de ERO también puede inducir rupturas de cadena de ADN. Además de las mutaciones genéticas, otras formas de

genotoxicidad observadas después de la exposición a los BPC incluyen la inducción de rupturas de cadenas de ADN y la segregación anómala de los cromosomas (Srinivasan *et al.*, 2001).

La unión de los BPC similares a dioxinas al AhR y la producción de metabolitos hidroxilados juegan un papel importante en la generación de efectos biológicos, pues representan una de las vías mediante la cual se desencadenan muchos de los efectos a los cuales se han asociado dichos compuestos.

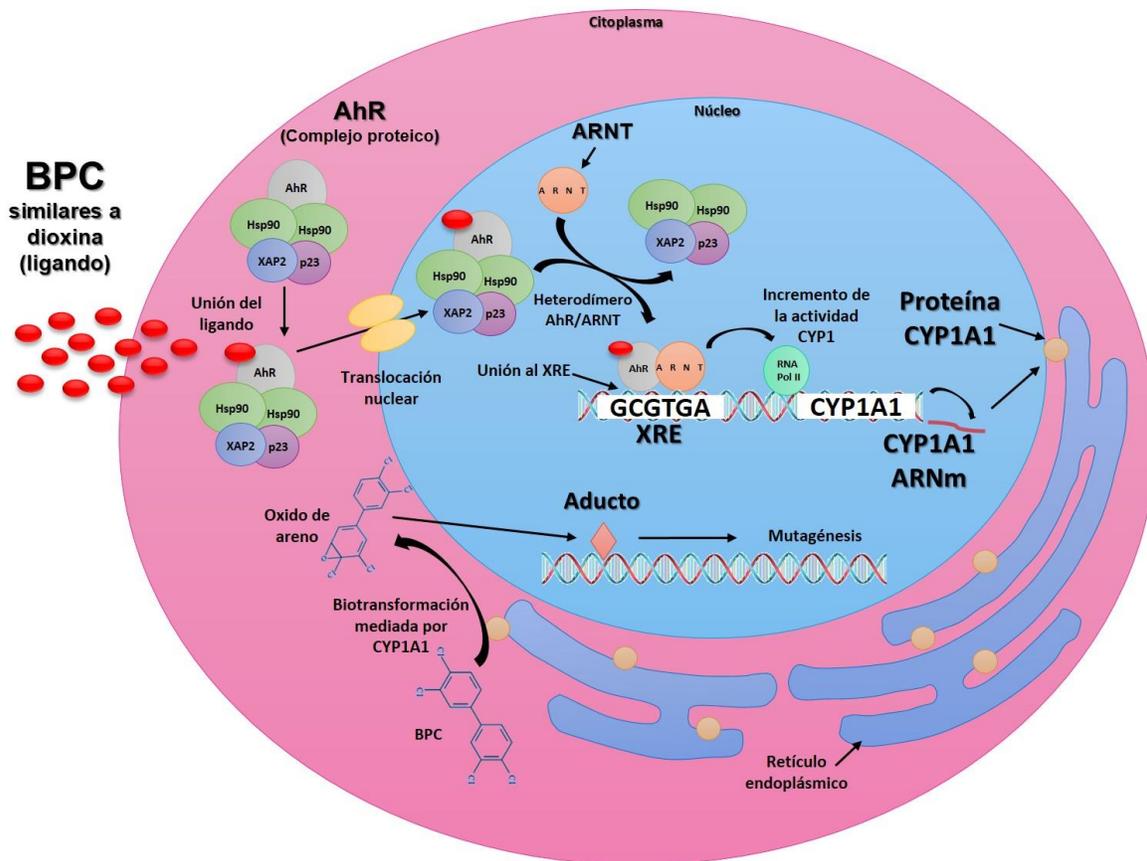


Figura 3. Mecanismo de toxicidad de los BPC similares a dioxina (Modificado de Murray *et al.*, 2014).

I.1.5.2 No dependientes del receptor aril hidrocarburo

Los congéneres de BPC que no presentan afinidad con el AhR, tienen un perfil diferente de acciones, mediante los cuales desencadenan diversos efectos en la

salud. Se ha reportado la capacidad de estos compuestos para unirse a diversos receptores tales como: el receptor constitutivo de androstano (CAR), receptor X de pregnano (PXR), receptor de glucocorticoides (GR), receptor de rianodina (RyR), receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR), receptor de estrógeno (RE), receptor de andrógeno (RA), receptor de progesterona (RP), transportador de monoamina vesicular (VMAT) y receptor de hormonas tiroideas (RT) (IARC, 2016).

Los BPC no similares a dioxinas y sus metabolitos ejercen un efecto antagónico sobre el PXR, cuya función principal es detectar la presencia de sustancias tóxicas y en respuesta regular la expresión de una gran cantidad de genes implicados en diferentes aspectos del metabolismo de xenobióticos. Entre los genes de la fase de oxidación se encuentra el de CYP3A, en el caso de la conjugación, el de las enzimas glutatión-S-transferasa, sulfotransferasa, UDP-glucuronosiltransferasa y carboxilesterasa y en el transporte Oatp2 y MRP2 (Watkins *et al.*, 2001).

El PXR se encuentra altamente expresado en el hígado, el intestino delgado y el colon. Notablemente, estos son los mismos tejidos donde los genes CYP3A son mayormente expresados e inducidos (Zhang *et al.*, 1999). En humanos, se ha detectado ARNm de PXR en tejido mamario tanto normal como neoplásico (Dotzlaw *et al.*, 1999). El antagonismo de la activación de PXR y la modulación hormonal inapropiada por subconjuntos de BPC antagonistas podría conducir a muchos de los efectos reproductivos y de desarrollo en seres humanos (Tabb *et al.*, 2004).

El fenobarbital (FB) es el prototipo de un gran grupo de xenobióticos estructuralmente diversos. Los BPC 101, BPC 153, BPC 180 y BPC 194, presentan un mecanismo de acción del tipo FB, mediante la activación del CAR. Dicho receptor, se encuentra localizado predominantemente en el citoplasma en su estado inactivo. Una vez que los BPC activan el CAR promueven su translocación al núcleo, donde induce la expresión de los genes CYP dentro de las subfamilias CYP2A, CYP2B, CYP2C y CYP3A, siendo los genes CYP2B los más inducidos, produciendo

de esta forma entre otros efectos, hipertrofia e hiperplasia en el hígado (Moore *et al.*, 2000; Kawamoto *et al.*, 1999).

También se ha evidenciado que la mayoría de los BPC no similares a dioxinas, son capaces de imitar algunas de las actividades biológicas de los estrógenos (Carpenter, 2006). En función de su estructura química, se ha sugerido que los congéneres de BPC que poseen sustituyentes orto pueden desencadenar respuestas estrogénicas después de la hidroxilación en una posición para (Gierthy *et al.* 1997). Bonefeld-Jorgensen *et al.*, (2001) reportó que los di-orto BPC 153, BPC 138 y BPC 180 actuaron sobre las funciones de RE y la proliferación celular, además de que el BPC 138 también actuó en actividades de RA. Por lo tanto, estos congéneres de BPC individuales tienen el potencial de competir con el ligando natural por la unión a su receptor. En cuanto al BPC138, también presentó actividad antiandrogénica significativa dependiente de la dosis.

Los OH-BPC con un grupo hidroxilo para o meta sustituido con átomos de cloro adyacentes en las posiciones orto y meta muestran similitudes estructurales con HT y, por lo tanto, una alta afinidad por transtiretina (TTR), una proteína de transporte de T4 (Purkey *et al.*, 2004), por ende, los OH-BPC pueden unirse con TTR e interrumpir el transporte de HT y retinol e inducir actividades enzimáticas microsómicas (Hallgren *et al.*, 2001). Ciertos congéneres de OH-BPC han mostrado hasta 10 veces mayor afinidad de unión por TTR con respecto a la T4 (Brouwer *et al.*, 1998). Debido a que la T4 puede pasar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) con unión a TTR, los BPC unidos a TTR también la pueden cruzar y acumularse en el cerebro. Por lo tanto, el desarrollo anormal del cerebro puede ser inducido por la acción directa de los BPC (Darnerud *et al.*, 1996).

Además, algunos estudios han reportado otros mecanismos para la interrupción de las HT por OH-BPC, como el de Kato *et al.*, (2000), donde se reportó que los metabolitos 3-MeSO₂-BPC 132, 3-MeSO₂-BPC 141, 3-MeSO₂-BPC 149 y 4-MeSO₂-BPC 149 redujeron los niveles de hormona tiroidea en sangre y aumentaron el peso

de la tiroidea y los niveles de proteína hepática CYP en ratas. También se ha informado que algunos 3-MeSO₂-BPC inducen altamente las enzimas P450, potencian el catabolismo de la progesterona y disminuyen las concentraciones plasmáticas de la hormona tiroidea (Karlson *et al.*, 2000).

Por otro lado, en ausencia de ligando, RT se une a una secuencia de nucleótidos específica, conocida como elemento de respuesta de la hormona tiroidea (ERT), localizada en la región promotora de su gen diana formando un complejo con un correpressor y su proteína relacionada, histona deacetilasa, e induce la represión de la transcripción. Una vez que un ligando se une a TR, los complejos disociados incluyendo coactivadores como el coactivador 1 del receptor esteroide (SRC-1), se unen para inducir la activación transcripcional de la UDP-glucuronosiltransferasa hepática involucrada en el metabolismo de la hormona tiroidea y el desplazamiento de T4 de las proteínas séricas (Lazar, 1993; Giesy y Kannan, 1998). Estos dos efectos parecen interactuar para producir una reducción significativa en los niveles circulantes de T4 y T3 totales y libres. Estas observaciones han llevado a la predicción de que los BPC producen déficits neurológicos al generar hipotiroidismo (Zhang y Lazar, 2000; Smith *et al.*, 2002).

I.2 Evaluación de riesgo potencial

El término riesgo hace referencia a la probabilidad de que una sustancia peligrosa produzca un daño, y el término peligroso se describe como la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos en los organismos (Peña *et al.*, 2001).

La evaluación del riesgo es un proceso cuyo objetivo es asignar magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de la contaminación. Por lo que, es un instrumento que puede utilizarse para definir si un sitio contaminado merece o no ser evaluado. Se han propuesto metodologías independientes para evaluar el riesgo ecológico y el riesgo a la salud humana, sin embargo, en la toma de decisiones resulta necesaria la aplicación de una metodología que englobe a la población

humana y a los receptores biológicos, por lo que se ha planteado una metodología para la evaluación integrada del riesgo (Torres *et al.*, 2006).

Por lo descrito, la metodología de evaluación integral de riesgo comprende los puntos clave de las metodologías de evaluación de riesgo a la salud y riesgo ecológico, de tal forma que propone cinco etapas principales: 1) descripción del sitio, 2) análisis de la contaminación ambiental, 3) valoración de los componentes bióticos, 4) valoración de los componentes humanos y 5) caracterización del riesgo (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

La primera etapa conciste en describir el sitio a evaluar, para ello, se deben obtener datos de identidad del sitio tales como: ubicación, actividades que se desempeñan, información geográfica y demográfica, características ecológicas, posibles contaminantes, rutas de exposición, entre otros, toda la información debe ser verificada con la visita al sitio (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

En la segunda etapa debe realizarse el análisis de la contaminación ambiental, lo que incluye un plan de muestreo donde se considera la matriz ambiental que más interese de acuerdo al contaminante en cuestión, los sitios de muestreo de mayor importancia previamente identificados en las rutas de exposición, así como, de áreas no contaminadas con el objetivo de obtener valores basales. Después de que se han determinado los compuestos a evaluar, se debe investigar sobre sus características toxicológicas y comportamiento ambiental, para realizar una priorización de contaminantes y poder definir aquellos que representen un riesgo (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

La siguiente etapa comprende la generación de un índice de toxicidad ambiental de las matrices evaluadas que representarían mayor riesgo para la biota. Luego se obtiene un índice de integridad biótica el cual proporciona un esquema de la salud del ecosistema y finalmente se realiza un estudio con las especies nativas, donde

se emplean diversos marcadores de exposición y efecto (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

La otra etapa imprescindible es la valoración de los componentes humanos, donde debe seleccionarse a la población de mayor exposición a los contaminantes y la que sea más susceptible a los efectos tóxicos. La evaluación de la exposición implica la cuantificación de biomarcadores de exposición y efecto. Posteriormente, se analizan los resultados obtenidos así como, las fuentes de datos estadísticos locales, estatales o nacionales que sean relevantes para la zona de estudio (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

Por último, se realiza la caracterización del riesgo, cuyo objetivo es conocer si existe un riesgo ecológico y/o humano, y si este existe, debe establecerse un modelo definitivo del sitio a fin de establecer las rutas de exposición que deben ser controladas para reducir el riesgo. De acuerdo con esta metodología, cada sección debe ser discutida por separado y subsiguientemente de forma integrada. En cada punto se discutirán las limitantes, incertidumbres y factores confundentes. Además, el análisis de la información se realizará con criterios rigurosos, consultando antecedentes científicos y contrastando con los valores de referencia reportados en la literatura científica (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios sobre la exposición a xenobióticos se han limitado a la cuantificación de sustancias químicas debido a que los efectos que provocan en la salud son complejos y difíciles de predecir. Estas características complican la detección de interacciones dañinas (Silins y Hogberg, 2011). Sin embargo, la metodología para la evaluación integrada del riesgo, plantea el uso de biomarcadores adecuados y confiables. El término biomarcador se define como un cambio bioquímico, morfológico o funcional que indica exposición, respuesta o susceptibilidad potencial a una sustancia o agente ambiental (Herkovits, 2000).

I.3 Biomarcadores de exposición

Los biomarcadores de exposición, son aquellos que evalúan en un organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico y una molécula o célula diana (OMS, 1993).

Estos biomarcadores se dividen en dos: 1) biomarcadores de dosis interna o de exposición y 2) biomarcadores de dosis efectiva o de efecto. Los primeros, indican el grado de exposición del organismo, puesto que miden un compuesto o sus metabolitos en fluidos corporales; y los segundos, indican que la exposición a un compuesto particular o su metabolito han alcanzado un blanco toxicológicamente significativo, los cuales se determinan midiendo aductos específicos en tejidos (Timbrell, 1998).

La dosis interna, es la cantidad total de un xenobiótico absorbido por el organismo durante un período de tiempo. De la cantidad total absorbida, solo una porción se entregará a un tejido diana. Una porción alcanzará las macromoléculas internas, y una proporción más pequeña alcanzará el sitio crítico en la macromolécula, con solo una fracción de la última cantidad actuando como la dosis biológicamente efectiva (OMS, 1993).

Esta dosis puede evaluarse mediante análisis adecuados de biomarcadores en muestras biológicas tales como: cabello, uñas, aire espirado, orina, heces, sangre y/o sus componentes (Mussali-Galante *et al.*, 2013). No obstante, deben considerarse factores propios del individuo y del contaminante para definir cual de los biomarcadores, tejidos o fluidos están más relacionados con la exposición. Por lo que, la selección del biomarcador debe estar precedido de un análisis riguroso de literatura para elegir el más adecuado (Díaz-Barriga, 1999).

Los biomarcadores para cada una de estas formas de dosis son útiles en la evaluación de riesgo, ya que, son una herramienta válida que permite identificar los

cambios biológicos producidos por la exposición a bajas concentraciones de diferentes compuestos, además ayudan en la comprensión de los mecanismos de acción de diferentes xenobióticos y sirven de base para la elaboración de guías de biomonitoreo (Arango, 2012).

I.3.1 Cuantificación de compuestos orgánicos persistentes en plasma sanguíneo

En la evaluación de los niveles de exposición de los seres humanos a los COP, es necesario disponer de medios de cuantificación idóneos. Considerando que estos compuestos son liposolubles, las matrices más adecuadas para su cuantificación son los tejidos grasos, la leche materna y el plasma sanguíneo. Varios estudios han empleado tejido adiposo en la cuantificación de los COP, pero debido a las dificultades para obtener muestras de tejido adiposo, el plasma sanguíneo se considera una matriz más adecuada para estudios de biomonitoreo en población humana, además de que, al estar en contacto con todos los tejidos y órganos, existe un equilibrio dinámico entre los contaminantes presentes en ellos y el plasma (Równicka-Zubik *et al.*, 2014).

Después de la absorción, los COP se unen a las lipoproteínas y se distribuyen a través de la sangre en los tejidos, primero en aquellos que son altamente perfundidos (hígado y músculo) y luego se redistribuyen a los tejidos con alto contenido en lípidos y baja perfusión (tejido adiposo y piel) (Garner y Matthews, 1998; Lotti, 2003). Las grasas de la sangre se encuentran en forma de glóbulos esféricos suspendidos en el plasma y a su vez, el glóbulo graso es una masa de triglicéridos de 3 a 4 micras de diámetro envuelta por una membrana formada por proteínas, fosfolípidos, colesterol, cerebrósidos y agua. Condición que favorece las características de fijación de los COP (Aguayo *et al.*, 2004).

Por ello, el proceso de separación y caracterización de los COP, no es sencillo, puesto que, implica una serie de tratamientos para la extracción del analito y la

posterior limpieza de los extractos. La preparación y la cantidad de muestra son pasos críticos en el procedimiento de análisis de estos compuestos, ya que pueden influir en los resultados. Por lo tanto, se requieren métodos para la cuantificación, que sean altamente selectivos y sensibles. Entre ellos, se encuentra la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM) (Korytár *et al.*, 2006).

Generalmente las concentraciones de los COP en plasma se expresan como valores estandarizados de lípidos, donde las concentraciones séricas se dividen por lípidos séricos. Las concentraciones de los COP suelen expresarse en ng/g de lípidos, lo que permite obtener valores que reflejen la carga corporal (Bergonzi *et al.*, 2009; Schisterman *et al.*, 2005; Rylander *et al.*, 2006). Para el caso de los BPC, en algunos estudios se han reportado las concentraciones como suma de congéneres individuales (IPCS, 2003). Sin embargo, la forma más apropiada es reportar congéneres individuales (Humphrey *et al.*, 2000).

I.4 Biomarcadores de efecto

Un biomarcador de efecto es una alteración bioquímica, fisiológica, conductual u otra que se pueda medir dentro de un organismo, la cual dependiendo de la magnitud, puede reconocerse como asociada con un impedimento o enfermedad establecida o posible (Knudsen y Hansen, 2007).

En los individuos existen amplias variaciones en la respuesta a dosis equivalentes de xenobióticos. El efecto de un compuesto en un individuo puede predecirse con mayor precisión a partir de los biomarcadores de efecto, los cuales, pueden no ser específicos para un único agente causal. Algunos marcadores biológicos pueden identificar daños incipientes por toxicidad a nivel preclínico y/o clínico, además de que permiten establecer la variación en los procesos de toxicidad y enfermedad que ocurre entre los diferentes individuos (Mendrick 2008).

Muchos biomarcadores de efecto se utilizan cotidianamente para ayudar en el diagnóstico clínico, pero para fines preventivos, un biomarcador de efecto ideal es aquel que mide el cambio que aún es reversible. Sin embargo, ciertos biomarcadores de efectos no reversibles pueden ser muy útiles en estudios epidemiológicos para brindar la oportunidad de una intervención clínica temprana (OMS, 1993).

Entre los biomarcadores de efecto se encuentran los que evalúan cambios bioquímicos, que brindan información sobre el daño oxidativo en ADN y proteínas, alteraciones en una amplia gama de enzimas, como enzimas reparadoras de ADN y proteínas de unión a xenobióticos, entre otros. Los biomarcadores de efecto también, miden las alteraciones en objetivos genéticos importantes como el ADN, para los cuales se han utilizado modelos *in vitro* e *in vivo*, dichos biomarcadores son de genotoxicidad ya que, evalúan las rupturas de ADN, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos, entre otros (Sarasin, 2003).

I.4.1 Análisis clínicos

Los análisis clínicos son una de las herramientas principales para evaluar el estado de salud de la población, ya que, brindan información fundamental en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades. Entre estos análisis, se encuentran la citometría hemática y la química sanguínea.

La citometría hemática determina el número, variedad, porcentaje, concentración y calidad de las células sanguíneas. Además, es el examen de laboratorio de mayor utilidad debido a que, en un solo estudio se analizan tres líneas celulares completamente diferentes: eritroide, leucocitaria y plaquetaria, que no sólo orientan a patologías hematológicas; sino también a enfermedades de diferentes órganos y sistemas (Fischbach, 1997).

En la serie eritroide los 3 valores principales son: la determinación de la de hemoglobina (HB) en g/dL; la proporción del hematocrito (HT), que es el volumen empacado de eritrocitos por litro de sangre, y la cuenta de reticulocitos (en porcentaje). Es importante considerar que estos parámetros varían de acuerdo con la altura sobre el nivel del mar, la edad y el género del paciente. Por otra parte, los índices eritrocitarios que indican el contenido de hemoglobina por eritrocito y el tamaño de cada uno de ellos, son datos importantes que orientan a las posibles etiologías en pacientes con anemia (Almaguer, 2003; Hurtado *et al.*, 2010; López-Santiago, 2016).

En cuanto a la evaluación de la línea leucocitaria, ésta consiste en la interpretación cuantitativa total de los leucocitos y de los subtipos celulares. La causa principal de modificaciones en el número total y diferencial de leucocitos son los procesos infecciosos locales o sistémicos. La leucocitosis es la elevación de leucocitos totales en la circulación; cuando es secundaria a infecciones bacterianas predominan los neutrófilos y puede haber un incremento de bandas; en cambio, ante la presencia de infecciones virales tiende a aparecer un marcado incremento de linfocitos. Las enfermedades hematológicas malignas son una causa frecuente de leucocitosis/leucopenia. En estos casos es necesaria una revisión cuidadosa del frotis de sangre periférica (Almaguer, 2003; Hurtado *et al.*, 2010; López-Santiago, 2016).

La tercera línea celular corresponde a las plaquetas, las cuales, son fragmentos anucleados del citoplasma de los megacariocitos presentes en la médula ósea, que sólo contienen algunas mitocondrias, glucógeno y gránulos específicos importantes para la coagulación. Las alteraciones numéricas de las plaquetas se pueden evaluar considerando el volumen plaquetario medio, si es elevado, indica una proliferación acelerada en la médula ósea (anemias hemolíticas, aumento de destrucción en la circulación), mientras que si es disminuido se asocia con reducción en la trombopoyesis (Almaguer, 2003; Hurtado *et al.*, 2010; López-Santiago, 2016).

Tal como se ha descrito anteriormente en este documento, los COP tienen la capacidad de generar efectos adversos en la salud humana. Por lo que, este análisis clínico también es de utilidad para evaluar la inmunotoxicidad en humanos, ya que, el recuento total de glóbulos blancos se ha considerado como un marcador útil de los cambios inmunes, sobre todo con números absolutos que proporcionan información más confiable que los porcentajes (Tryphonas, 2001).

Por otro lado, la química sanguínea, es una serie de pruebas realizadas en sangre para determinar la cantidad de ciertas sustancias en el cuerpo. Entre las sustancias que se analizan se incluyen: glucosa, proteínas, lípidos, enzimas, hormonas y electrolitos. Las cuales, dan indicio sobre las condiciones del metabolismo en el cuerpo y de cómo funcionan ciertos órganos (NCI, 2017).

La química sanguínea parcial comprende la determinación de urea, creatinina, nitrógeno ureico y glucosa. Los primeros tres parámetros son indicadores del funcionamiento renal y el cuarto proporciona información sobre el desarrollo de diabetes. Por un lado, la creatinina es una sustancia de producción endógena derivada del metabolismo de la creatina y fosfocreatina en el tejido muscular, por lo que, la creatinina libre no es utilizada por el organismo, solo es un producto de desecho (Villegas, 2015).

La mayoría de la creatinina es filtrada libremente por el glomérulo y no se reabsorbe ni metaboliza por los túbulos renales. Si el filtrado del riñón es deficiente, los niveles de creatinina en la sangre se elevan, por lo que, la determinación de creatinina sérica se utiliza principalmente para evaluar la función renal, debido a que es un buen indicador de la tasa de filtración glomerular (TFG) que se define como el aclaramiento renal de una sustancia particular del plasma y se expresa como el volumen del plasma que puede ser completamente aclarado de esa sustancia en unidad de tiempo (Bilbao *et al.*, 2009).

En cuanto a la urea, es el producto principal de desecho del metabolismo de las proteínas provenientes tanto de la dieta como del recambio fisiológico, representando la forma mayoritaria de eliminación de nitrógeno. Es muy soluble en agua, lo que le permite filtrarse libremente por el glomérulo y ser reabsorbida por los túbulos proximales y distales. El contenido de urea se puede expresar como concentración de urea o bien como, concentración de nitrógeno ureico (Traynor *et al.*, 2006; Villegas, 2015).

Un aumento en el nitrógeno ureico se asocia con diversos factores, tales como: 1) Causas prerrenales, donde la manifestación más común es la hipovolemia. Debido a la escasez de suministro de sangre renal, la tasa de filtración glomerular se reduce, lo que provoca un aumento de nitrógeno ureico. El cual puede ser resultado de una hemorragia gastrointestinal o diarrea. 2) Causas intrarenales, como glomerulonefritis, pielonefritis crónica y nefritis tóxica. La deficiencia de la función renal causa una excreción reducida y conduce a la acumulación de urea (Wang *et al.*, 2014).

La glucosa es la principal fuente de energía del organismo, es utilizada por el hígado en la formación de glucógeno, en el mantenimiento del nivel glucémico, en la formación de sustancias grasas, en la glucólisis y en la síntesis de aminoácidos y glucoproteínas. El interés clínico de la cuantificación de la glucosa en sangre, se debe en gran parte a la elevada incidencia de diabetes mellitus, como trastorno metabólico más frecuente y de graves consecuencias clínicas (Portillo *et al.*, 1997; Voet y Voet, 2006).

En humanos, los niveles de glucosa en ayunas están regulados dentro de un estrecho rango homeostático; los niveles elevados de glucosa son un signo de secreción o reducción en la acción de la insulina y se usan para evaluar y diagnosticar la diabetes tipo 2. Los niveles elevados de glucosa en ayunas dentro del rango normal no diabético predicen el riesgo futuro de diabetes y se asocian con

la enfermedad cardiovascular incidente en individuos no diabéticos (Barker *et al.*, 2011).

I.4.2 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis

El ensayo de micronúcleos (MN) fue desarrollado por Schmid en 1975, para emplearse en medula ósea de ratón. Posteriormente, se implementó en diversos tejidos tanto en especies animales (eritrocitos, fibroblastos, linfocitos y células epiteliales) como vegetales (meristemos) (Zúñiga y Gómez, 2006).

La realización de este ensayo implica la utilización de células en constante división, por lo que, la evaluación de (MN) en humanos se ha realizado principalmente en epitelio bucal y linfocitos de sangre periférica. Las células epiteliales exfoliadas se pueden recolectar fácilmente mediante procedimientos no invasivos. Además, alrededor del 90% de los cánceres surgen en los tejidos epiteliales al estar en contacto inmediato con agentes genotóxicos inhalados e ingeridos (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

Sin embargo, el empleo de linfocitos es sumamente importante, ya que, los linfocitos desde la sangre migran al bazo, ganglios linfáticos y otros tejidos periféricos, para luego regresar a la sangre. En este sentido, los linfocitos con aberraciones cromosómicas que han sido inducidas en cualquier parte del cuerpo, estarán en la sangre periférica, por lo que, estos linfocitos se pueden emplear como modelo experimental, permitiendo detectar el daño cromosómico inducido en la sangre periférica y el inducido en cualquiera de los compartimentos donde estas células se distribuyen (Wuestermann y Cronkite, 1995; Arencibia y Rosario, 2009).

Fenech y Morley (1985), mejoraron la técnica descrita por Schmid y desarrollaron el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN: cytokinesisblock micronucleus) cuyo fundamento es el empleo de citocalasina-B, para impedir la citocinesis celular, después de que la célula ha sufrido una división nuclear,

permitiendo así, la obtención de células binucleadas (BI) en las que se evaluarán MN.

Desde la década de los 80, el ensayo fue adoptado por numerosos laboratorios a nivel mundial, por lo que, en 1997 se inició el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), donde se recabaron datos de 25 laboratorios y 7 000 individuos de diferentes países, para ser analizados e identificar las fuentes y los niveles de variabilidad, así como, la reproducibilidad del ensayo y finalmente poder validar la técnica (Fenech *et al.*, 1999).

Inicialmente, el ensayo se desarrolló para evaluar micronúcleos (MN) específicamente en células binucleadas (BI). Sin embargo, a medida que los mecanismos de formación de MN y otros biomarcadores asociados al daño del ADN como los puentes de cromatina (PC), los núcleos lobulados (NL), la apoptosis (AP) y la necrosis (NC) se hicieron más evidentes, este método evolucionó al ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis enfoque citoma (CBMN: cytokinesisblock micronucleus “cytome”) diseñado para capturar y evaluar todos estos eventos (Figura 4) (Fenech, 2006).

Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no se incorporaron en los núcleos principales en la división celular (Fenech y Morley, 1985). La formación de MN puede ser provocada por agentes clastogénicos que inducen la ruptura de la doble hélice de ADN, originando fragmentos acéntricos incapaces de unirse al huso, por lo que quedan rezagados en la mitosis. Por otro lado, los agentes aneugénicos inhiben la formación del huso durante la mitosis, generando cromosomas enteros retrasados en anafase, que quedan fuera del núcleo al final de la mitosis (Lindberg *et al.*, 2007).

Los PC se producen cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos se empujan a los polos opuestos de la célula en anafase. En las células BI es posible observar PC porque se inhibe la citocinesis y finalmente se forma la membrana

nuclear alrededor de los cromosomas. Estos PC son importantes porque proporcionan una medida de reordenamiento cromosómico (Fenech y Crott, 2002).

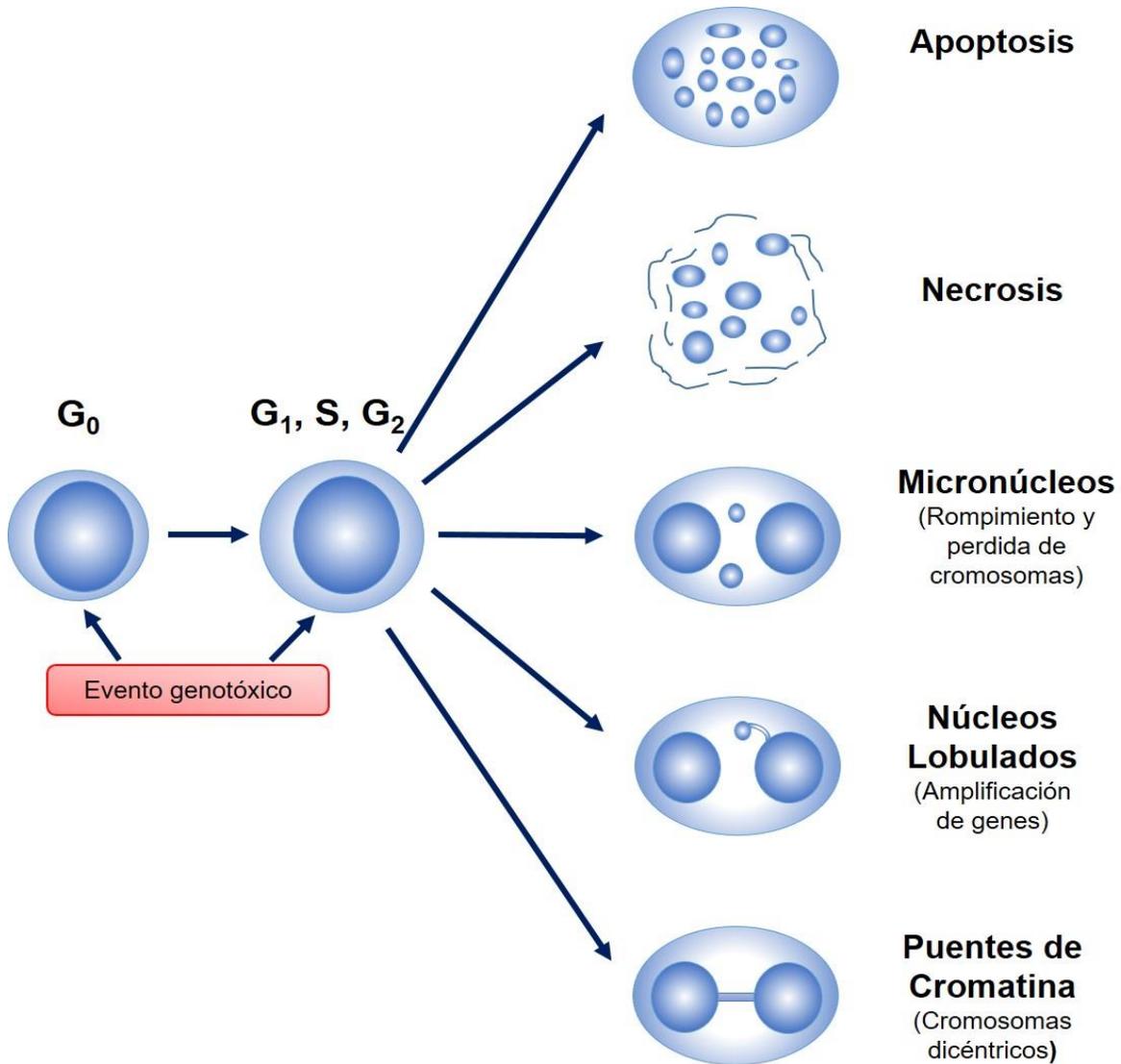


Figura 4. Biomarcadores de daño al ADN, evaluados mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis enfoque citoma (Modificado de Fenech, 2007).

Otra de las anomalías nucleares evaluadas son los NL. Estos se forman en la fase S del ciclo celular a partir de la eliminación de ADN amplificado que se localiza selectivamente en sitios específicos de la periferia del núcleo (Shimizu *et al.*, 1998).

Por otro lado, eventos genotóxicos como los aductos de ADN, aductos de proteínas y ruptura en la cadena de ADN pueden inducir apoptosis o necrosis. La apoptosis es una muerte celular controlada, donde la membrana plasmática se conserva hasta una etapa tardía del proceso, permitiendo que los gránulos se desintegren en vesículas unidas a la membrana sin fugas de los componentes intracelulares. En contraste, la necrosis provoca una reacción inflamatoria local debido a la liberación de enzimas tóxicas en el tejido circundante (Kirsch-Volders y Fenech, 2001).

En general, los eventos antes descritos, pueden ocurrir simultáneamente y en diferentes grados dependiendo de la dosis y del agente químico presente en el organismo. Su evaluación es importante, puesto que permite obtener información sobre el nivel de daño y reparación del ADN, la inestabilidad cromosómica, anomalías mitóticas y muerte celular, permitiendo la medición de diversos aspectos de la disfunción celular y nuclear (Fenech, 2007).

El biomonitoreo humano requiere metodologías precisas, sensibles y sencillas para evaluar los efectos genéticos tempranos causados por xenobióticos. El ensayo de MN tiene gran importancia toxicológica, pues, en las últimas décadas ha mostrado ser una herramienta eficaz en la detección de daño a nivel cromosómico en poblaciones expuestas a diferentes factores ambientales, ocupacionales y estilo de vida (Fenech, 2000; Matheus-Lobo y Bolaños, 2014).

I.4.3 Ensayo cometa

El ensayo cometa también conocido como electroforesis en gel de células individuales, es una prueba sensible, versátil, simple y rápida, utilizada para cuantificar el daño al ADN (Tice *et al.*, 2000). Se basa en el principio de que las rupturas de cadena reducen el tamaño de la gran molécula dúplex de ADN, y durante la electroforesis las hebras relajadas se separan (Collins *et al.*, 2008).

Técnicamente, el ensayo consiste en embeber células viables en gel de agarosa, posteriormente lisarlas para obtener los núcleos y finalmente someterlas a electroforesis, para conseguir que los fragmentos de ADN dañado viajen hacia el ánodo, permitiendo de esta manera la formación del cometa, con una cabeza (ADN intacto) y una cola (ADN dañado), que es evaluado después de la tinción fluorescente (Moller, 2006).

Los primeros en utilizarlo fueron Ostlin y Johanson (1984), sin embargo, las condiciones neutras que emplearon, únicamente les permitieron detectar el daño inducido por rupturas de cadenas dobles de ADN. Singh *et al.*, (1988), modificaron el pH a condiciones alcalinas para poder analizar la ruptura del ADN de hebras simples y dobles.

Actualmente, el ensayo ha sido adaptado en etapas de lisis y tiempo de electroforesis para detectar daños al ADN como: rupturas de cadenas simples y dobles, sitios álcali lábiles, daño oxidativo, enlaces cruzados, aductos, apoptosis y necrosis (Bajpayye *et al.*, 2013). Además, las variaciones en los componentes del ensayo han permitido su uso en diversos organismos, entre ellos: bacterias algas, plantas, hongos, invertebrados acuáticos y terrestres (bivalvos, anélidos, insectos) y vertebrados (peces, anfibios, aves y mamíferos, incluido el ser humano) (Dhawan *et al.*, 2009).

En el caso de humanos, se han utilizado células de epitelio bucal, espermatozoides, epitelio nasal, células del cristalino (extraído con cataratas) y biopsias (extraídas durante el examen clínico o cirugías). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han realizado con linfocitos aislados (monocitos y linfocitos) y en sangre completa (Collins *et al.*, 2013).

El uso de sangre completa o la fracción de leucocitos aislados es una de las variaciones importantes en la técnica, debido a que el empleo de sangre completa es más simple, pero conduce a una población celular menos homogénea y a

posibles interferencias. Las células nucleadas en sangre entera consisten principalmente en neutrófilos (60-75%) seguido de linfocitos (20-30%), mientras que la fracción de leucocitos consiste entre 95-98% de linfocitos. Empero, en algunos casos la sangre completa es una ventaja, ya que, evita el daño adicional al ADN, inducido durante el aislamiento de las células mononucleares (Giovannelli *et al.*, 2003).

Debido a sus múltiples aplicaciones en diversos organismos y tipos celulares, el ensayo cometa se ha convertido en una de las principales herramientas para detectar el daño genotóxico *in vitro* o *in vivo* causado por una gran variedad de agentes tanto físicos como químicos, por lo que es útil en estudios toxicológicos, genéticos y ambientales (Valverde y Rojas, 2009; Kumaravel *et al.*, 2009).

En los últimos 20 años, el ensayo se ha aplicado en estudios de población humana para evaluar el estado nutricional (Moller y Loft, 2006), el daño oxidativo (Duthie *et al.*, 1996; Van de Berg *et al.*, 2001), la reparación de ADN (Dusinska *et al.*, 2012), su relación con enfermedades neurodegenerativas (Migliore *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2004), cáncer (Lorenzo *et al.*, 2009; Vasavi *et al.*, 2010; Sigurdson *et al.*, 2011), así como, en la exposición ocupacional y ambiental a diversos tipos y dosis de agentes genotóxicos (Koppen *et al.*, 2007; Piperakis *et al.*, 2000; Balachandar *et al.*, 2010). Por lo que, contribuye de manera útil a la cuantificación del efecto biológico aún cuando no hay marcadores de exposición, puede ayudar con la identificación temprana de los riesgos para la salud (Collins *et al.* 2013).

II. ANTECEDENTES

II.1 Contaminación con compuestos orgánicos persistentes en Tlaxcala

Los estudios sobre compuestos orgánicos persistentes en el estado de Tlaxcala son escasos, a continuación, se presenta una descripción de estudios que abordan la problemática de contaminación en matrices ambientales y de sus efectos en modelos biológicos, los cuales han dado paso a la importancia de realizar investigaciones en población humana que se encuentra en riesgo potencial.

Juárez-Santacruz *et al.* (2013), evaluaron la presencia de COP en sedimentos superficiales de los ríos Zahuapan y Atoyac, así como, su efecto genotóxico en *Vicia faba* de éstos y de suelos agrícolas del municipio de Tepetitla de Lardizabal. Analizaron isómeros de HCH, DDT y su metabolito DDE, HCB, mirex, aldrín, y 41 congéneres de BPC. Las concentraciones de HCB, Σ DDT, Σ HCH y Σ BPC variaron de 45 a 450, 3 a 27, 138 a 510 y 59 a 1876 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso seco, respectivamente. En el río Atoyac se encontraron los niveles más altos de HCB, isómeros de HCH, y BPC, estos compuestos tienen el potencial para causar un impacto ambiental. Por otro lado, la prueba biológica muestra que ambos, sedimentos y suelos agrícolas, poseen un potencial genotóxico, dado que se presentó un incremento en la frecuencia de MN en *V. faba*.

Netzáhual-Lopantzi, (2013) evaluó los sedimentos del río Texcalac y suelos agrícolas aledaños a éste, los valores más altos de BPC, en sedimento se ubicaron en un punto cercano a una zona de cultivo (32 547 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y en otro cerca de la barranca San Cosme (24 538 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Estas concentraciones superan la norma de Nueva Jersey (NJDEP, 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para la protección de la biota. En suelos agrícolas el valor máximo fue de 88 022 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en una muestra localizada a la orilla de la barranca Sambrano, superando el límite máximo permisible de la norma oficial mexicana de protección ambiental (NOM-133-SEMARNAT-2000, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Juárez-Santacruz *et al.* (2015) cuantificaron algunos COP (p, p' DDT, p,p'DDE y 41 congéneres de BPC) en suelos agrícolas de los municipios de Tepetitla y Nativitas. Además evaluaron la capacidad genotóxica de estos y sus extractos orgánicos usando a *V. faba* como bioindicador. Los valores más altos de BPC se encontraron en 2 muestras de Tepetitla (4 671 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 26 983 $\mu\text{g}/\text{kg}$, T1 y T2 respectivamente) superando el límite máximo permisible de la norma oficial mexicana de protección ambiental (NOM-133-SEMARNAT-2000, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y de las guías Canadienses sobre la calidad del suelo para el medio ambiente y la salud (SQGE=500 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Respecto a la prueba de genotoxicidad, reportaron porcentajes de fragmentación de ADN más altos y estadísticamente significativos ($p < 0.05$) que el control negativo, tanto en suelos agrícolas como en los extractos orgánicos.

II.2 Genotoxicidad por exposición a los COP

A nivel internacional se han realizado diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, enfocados a evaluar los efectos producidos por los COP en población humana. Entre éstos se encuentra la genotoxicidad, debido a que la inestabilidad genómica conlleva al desencadenamiento de diversas patologías. Dicha inestabilidad puede ser medida a través de cambios cromosómicos y moleculares. Por lo que, el empleo de los ensayos de micronúcleos y cometa son importantes para detectar daños de este tipo.

Gerić *et al.* (2012) analizaron *in vitro* los efectos genotóxicos del DDT y sus metabolitos, utilizando los ensayos de micronúcleos con bloqueo de citosinesis y cometa. Expusieron a los linfocitos durante 1, 6 y 24 h, a p, p'-DDT (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), p, p'-DDE (4.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y p, p'-DDD (3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el período de exposición de 24 h mostró un incremento significativo en el número de células micronucleadas de 23.5 ± 3.54 , 13.5 ± 0.71 y 16.5 ± 6.36 para DDT, DDE y DDD respectivamente, en comparación con el control 2.5 ± 0.71 . Un efecto similar se observó en el ensayo cometa donde el porcentaje de ADN en la cola de los cometas para los compuestos analizados fue

de 17.24 ± 0.55 , 11.21 ± 0.56 y 9.28 ± 0.50 para DDT, DDE y DDD respectivamente, en comparación con el control (1.81 ± 0.16).

En la Provincia de Córdoba, Argentina, Gentile *et al.* (2012) evaluaron el efecto genotóxico por exposición laboral a plaguicidas mediante el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica en un grupo de 20 trabajadores rurales y contrastaron sus resultados con un grupo de referencia de 10 individuos, reportando diferencias estadísticamente significativas (t de Student, $p < 0.0005$) entre los dos grupos (15.15 ± 5.10 y 7.20 ± 1.55 MN/1000, respectivamente)

En Brasil, se han realizado estudios que evalúan el efecto genotóxico en trabajadores expuestos a mezclas de agentes químicos presentes en formulaciones de fungicidas, herbicidas e insecticidas. Benedetti *et al.* (2013) en la ciudad de Espumoso, evaluaron a un grupo de trabajadores de la soja mediante el ensayo cometa en leucocitos periféricos y el ensayo de micronúcleos en células bucales exfoliadas. Analizaron un total de 127 individuos, 81 expuestos y 46 controles. La evaluación de las células epiteliales presentó un índice de daño mayor en el grupo expuesto respecto al grupo control (Mann-Whitney $p < 0,001$, 38.5 ± 19.9 vs 19.6 ± 10.3). En cuanto a la frecuencia de MN, hubo diferencias estadísticamente significativas (Mann-Whitney $p < 0,001$) 3.4 ± 2.5 vs 1.5 ± 1.7 entre ambos grupos respectivamente.

Khayat *et al.* (2013) evaluaron 41 trabajadores expuestos a pesticidas y 32 sujetos como grupo control. Para el ensayo cometa, utilizaron sangre periférica y para micronúcleos, tomaron muestras de epitelio bucal. El daño al ADN se midió por la longitud de la cola, el porcentaje de ADN en la cola, el olive tail moment (OTM) y el tail moment (TM). En el ensayo cometa, reportaron diferencias estadísticamente significativas en tres parámetros entre los grupos expuesto y control (5.71 ± 1.63 vs 1.13 ± 1.25 , 0.54 ± 0.21 vs 0.09 ± 0.13 y 0.18 ± 0.13 vs 0.02 ± 0.04 , porcentaje de ADN en la cola, OTM y TM, respectivamente). El grupo expuesto presentó un

incremento hasta de 8 veces en la frecuencia de MN, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$).

Wilhelm *et al.* (2014) evaluaron los efectos genotóxicos en floricultores ($n=37$) en una región del estado de Rio Grande do Sul, en el sur de Brasil, los datos se contrastaron con 37 personas no expuestas. El análisis se realizó en epitelio oral para la prueba de MN y en sangre periférica el ensayo cometa. En cuanto a las frecuencias de MN y otras anomalías nucleares no se registraron diferencias entre los grupos. Sin embargo, en el ensayo cometa encontraron que tanto la frecuencia de las células dañadas como el índice de daño fueron significativamente mayores en el grupo expuesto (4.22 ± 3.89) respecto al control (1.51 ± 2.55).

En un estudio realizado en Colombia por Varona-Uribe *et al.* (2014) cuantificaron 31 pesticidas en sangre, suero y orina (15 organoclorados, 10 organofosforados, 5 carbamatos y etilentiourea), de los cuales 24 (77.42 %) estaban presentes en 223 trabajadores de cultivos de arroz. Mediante el uso del análisis de factor de máxima verosimilitud identificaron 8 mezclas diferentes, entre ellas una que contenía hexacloruro de benceno alfa y beta (α -BHC y β -BHC) y hexaclorobenceno (HCB) la cual se asoció con un mayor porcentaje de daño en el ADN, evaluado por el ensayo cometa.

Entre los estudios que han evaluado la genotoxicidad por exposición a los COP en población humana en México, se encuentra el realizado por Herrera-Portugal *et al.* (2005), quienes compararon a un grupo de 30 niños residentes de áreas rociadas con DDT en Chiapas, con 30 niños quienes vivían en áreas con menor exposición a DDT. La cuantificación de DDT y DDE, así como, el ensayo cometa se realizaron en sangre. Los niños con menor exposición, tuvieron una concentración sanguínea media de 15.9 ± 8.2 de DDT y 58.24 ± 29.2 g/L DDE significativamente más alta que los controles (1.9 ± 3.6 y 9.2 ± 5.7 g/L, respectivamente). En cuanto a los valores promedio de la cola del cometa se encontró diferencia significativa entre los dos

grupos examinados (media 26.83 ± 6.05 vs 17.13 ± 3.69 , $p < 0.001$) y momento de la cola (media 7.13 ± 2.9 vs 1.21 ± 2.19 , $p < 0.001$).

En el estado de Guerrero Carbajal-López *et al.* (2015) evaluaron el efecto genotóxico de plaguicidas, utilizando el ensayo cometa y el ensayo de micronúcleos en células bucales exfoliadas. Compararon 111 trabajadores agrícolas de tres comunidades rurales (Arcelia 62, Ajuchitlan 13 y Tlapehuala 36), con 60 personas no expuestas. Los resultados del estudio revelaron que la longitud de la cola aumentó significativamente en los individuos expuestos (222.23 ± 8.1 , 194.30 ± 16.4 y 155.78 ± 6.7 , para Arcelia, Ajuchitlan y Tlapehuala respectivamente) respecto al control (106.08 ± 2.6) y la frecuencia de MN presentó un aumento de 0.88 ± 0.56 en los no expuestos a 1.66 ± 0.20 , 3.23 ± 0.65 y 2.1 ± 0.31 en Arcelia, Ajuchitlan y Tlapehuala respectivamente).

III. JUSTIFICACIÓN

Algunos estudios han demostrado que el río Texcalac y suelos aledaños a este presentan niveles elevados de compuestos orgánicos persistentes, entre ellos, los Bifenilos Policlorados (BPC) cuya persistencia y toxicidad pueden representar un riesgo para la salud humana. Sin embargo, las incipientes investigaciones ecotoxicológicas realizadas en la comunidad de Santa María Texcalac, sugieren la necesidad de realizar estudios que permitan conocer el nivel de daño genético producido por dichos contaminantes ambientales, sobre todo en poblaciones en edades tempranas, puesto que el daño al ADN tiene efectos adversos que disminuyen la calidad de vida.

El biomonitoreo en población humana es complejo y de difícil evaluación, ya que en algunos casos las rutas y vías de exposición no son evidentes, sin embargo con este trabajo se pretende dar los primeros pasos en términos de evaluación de riesgo en salud humana, mediante la cuantificación de los COP en sangre empleando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y biomarcadores que por su alta sensibilidad para detectar daño al ADN, son un indicador de efectos por exposición a agentes genotóxicos, lo que generará información que puede contribuir a la creación de conciencia ciudadana y de propuestas en búsqueda de estrategias que minimicen la exposición y prevengan los efectos adversos a la salud, mejorando la calidad de vida de los habitantes de este lugar.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Evaluar el riesgo potencial por exposición a compuestos orgánicos persistentes en una población juvenil de Texcalac, mediante biomarcadores de exposición y efecto genotóxico.

IV.2 Objetivos específicos

- a. Evaluar la exposición a través de la cuantificación de los COP en plasma.
- b. Analizar algunos parámetros clínicos para conocer el estado general de salud de la población.
- c. Determinar los niveles de toxicidad a nivel citogenético y molecular, mediante la frecuencia de micronúcleos e índice de daño al ADN en linfocitos de sangre periférica.
- d. Comparar los parámetros clínicos, los biomarcadores de efecto y los de exposición con una población de referencia.

V. HIPÓTESIS

La población de Santa María Texcalac esta potencialmente expuesta a compuestos orgánicos persistentes, por lo que presentará niveles elevados de estos compuestos en sangre y tendrán una asociación positiva con los niveles de genotoxicidad.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Zonas de estudio

En el estado de Tlaxcala se encuentran 9 zonas industriales: Ciudad Industrial Xicohtécatl I Tetla, Ciudad Industrial Xicohtécatl II Huamantla, Ciudad Industrial Xicohtécatl III Tlaxco, Corredor Industrial Malinche, Corredor Industrial Apizaco–Xalostoc-Huamantla, Corredor Industrial Panzacola, Parque Industrial Xiloxotla, Parque Industrial Ixtacuixtla y Parque Industrial Calpulalpan, de estas, la mayoría son del giro automotriz, textil, plástico, agroquímico, papelerero, metal-mecánico, químico, alfarería y cerámica (Figura 5) (SEDECO, 2015).

Por otro lado, la agricultura representa el 58.5 % de la superficie del estado, el 98.0 % de las unidades de producción emplean plaguicidas con el fin de combatir, controlar o evitar el desarrollo de malezas, insectos, hongos u otro tipo de plagas que atacan a los cultivos (INEGI, 2012).

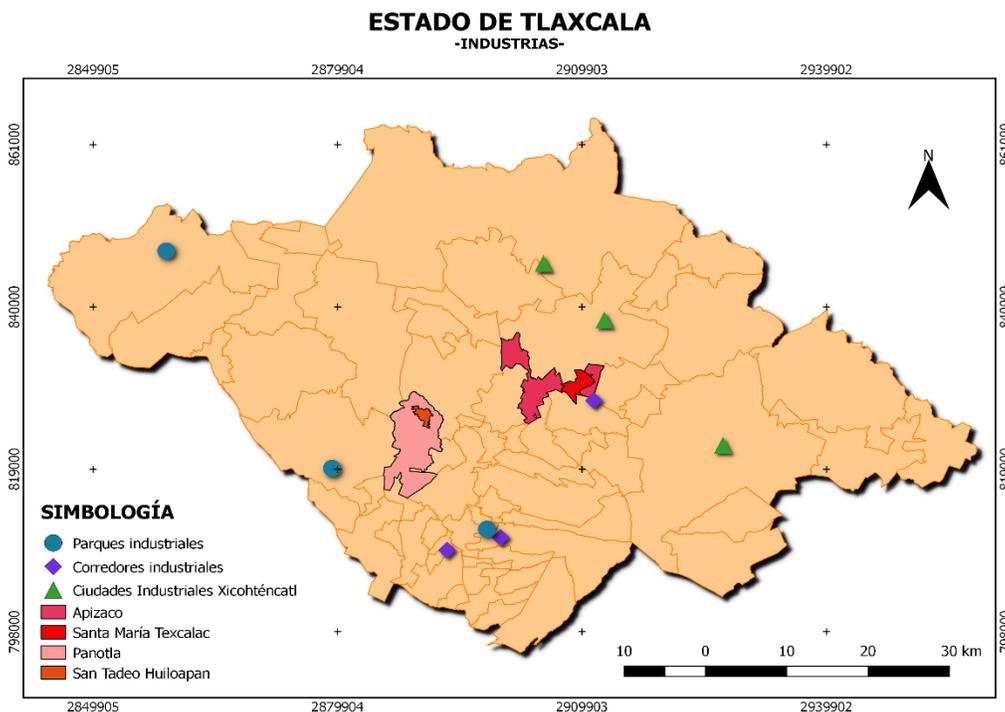


Figura 5. Mapa de las zonas industriales (Fuente propia, elaborado con QGIS versión 2.18.15).

VI.1.1 Zona de probable riesgo

La comunidad de Santa María Texcalac se encuentra localizada en el municipio de Apizaco, Tlaxcala, a una altitud de 2,420 metros sobre el nivel del mar. Sus coordenadas geográficas son: latitud norte 19° 25' 17.093" y longitud oeste 98° 05' 26.210". Colinda al norte con la comunidad de Guadalupe Texcalac y el municipio de Tetla de la Solidaridad; al sur con el municipio de San Andrés Ahuahuastepec; al este con el municipio de San Cosme Xalostoc y al oeste con la comunidad de San Luis Apizaquito y la colonia San Isidro (Figura 6) (INEGI, 2017).

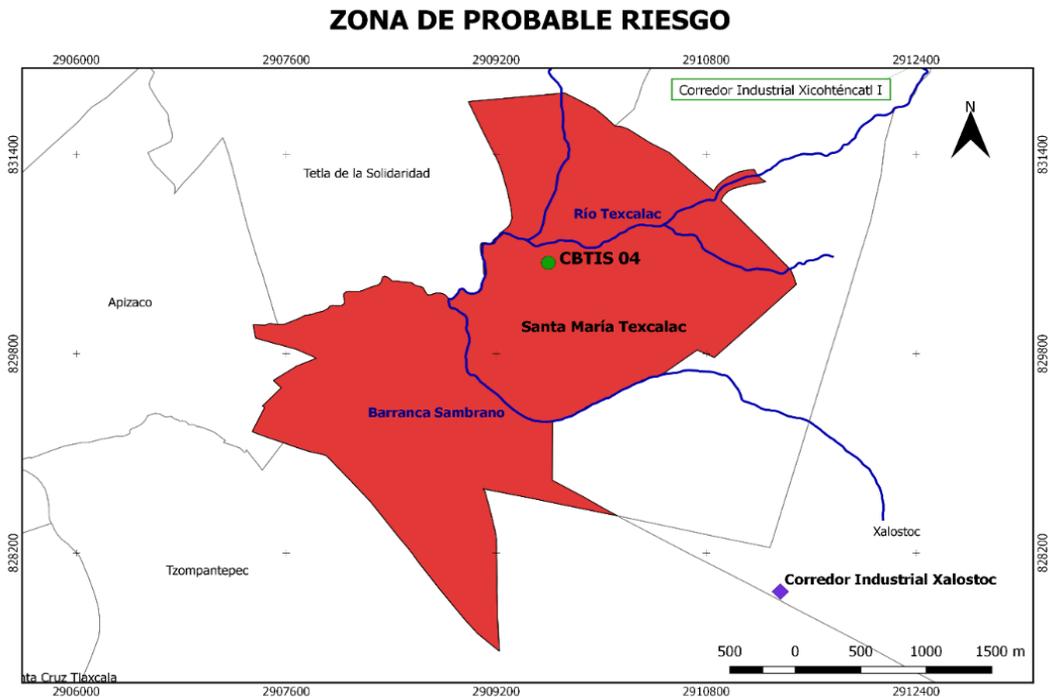


Figura 6. Mapa de la comunidad de Santa María Texcalac (Fuente propia, elaborado con QGIS versión 2.18.15).

Esta comunidad se encuentra potencialmente impactada por los desechos provenientes de industrias que se localizan al norte (Ciudad Industrial Xicoténcatl I) y al este (Corredor Industrial Xalostoc), donde se encuentran empresas de giro agroquímico, químico, papelerero, metal-mecánico y plástico (SEDECO, 2015), derivado de sus procesos de producción estas empresas pueden ser fuentes de compuestos orgánicos persistentes. Por otro lado, el 40 % de la superficie de la

comunidad está dedicada a la agricultura y en el 20 % de esta se emplean plaguicidas.

VI.1.2 Zona de bajo riesgo

La localidad de San Tadeo Huiloapan se localiza en el municipio de Panotla, Tlaxcala en las coordenadas geográficas 19° 22' 59.826" latitud norte y 98° 16' 17.702" longitud oeste a una altitud de 2 544 msnm. (INEGI, 2017). Colinda al noreste con el municipio de Xaltocan, al noroeste con la comunidad de San Mateo Huexoyucan, al suroeste con la comunidad de San Francisco Temetzontla y al noreste con el municipio de Totolac (Figura 7) (INEGI, 1995).

Esta comunidad no se encuentra cerca de corredores industriales y sus principales actividades se centran en la agricultura, ganadería, silvicultura y pesca, razón por la cual fue elegida como grupo de referencia.



Figura 7. Mapa de la zona de bajo riesgo (Fuente propia, elaborado con QGIS versión 2.18.15).

VI.1.3 Selección de la población

La población de estudio (grupo de probable riesgo) estuvo constituida por 30 estudiantes de ambos sexos, de nivel medio superior de la comunidad de Santa María Texcalac, Apizaco, Tlaxcala. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) edad de 15 a 19 años; 2) residencia mínima de 2 años en Santa María Texcalac; 3) no consumir bebidas alcohólicas y de preferencia no fumadores; 4) no expuestos ocupacionalmente a sustancias tóxicas.

El grupo de bajo riesgo o de referencia, estuvo representado por una población escolar de 45 individuos de ambos sexos, de nivel medio superior, pertenecientes a la comunidad de San Tadeo Huiloapan, Panotla, Tlaxcala. Para este grupo los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) edad de 15 a 19 años; 2) no vivir cerca zonas industriales o agrícolas; 3) no consumir bebidas alcohólicas y de preferencia no fumadores; 4) no expuestos ocupacionalmente a sustancias tóxicas.

A ambos grupos de estudio se les aplicó un cuestionario (Anexo 1) para conocer el sitio de residencia, las probables fuentes de exposición, hábitos domésticos y personales así como el tipo de alimentación.

El proyecto fue aprobado por el comité de Bioética de la facultad de Agrobiología (Anexo 2). Para obtener la muestra sanguínea se solicitó el consentimiento informado, voluntario y firmado por el padre, madre o tutor de cada participante (Anexo 3).

VI.1.4 Toma de muestra biológica

Se realizó una flebotomía en el área antecubital, empleando tubos Vacutainer^{MR} con heparina de sodio (Ref.367878, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para realizar la técnica de micronúcleos y la separación de plasma; tubos con EDTA (Ref. 368171, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para la Biometría hemática y tubos sin anticoagulante (Ref. 368175, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

para realizar la Química sanguínea. Las muestras se trasladaron en hieleras al laboratorio de análisis clínicos La Paz y al laboratorio de Toxicología ambiental del CIGyA para los análisis correspondientes.

VI.2 Cuantificación de compuestos orgánicos persistentes por CGEM

VI.2.1 Separación de plasma

Los tubos vacutainer que contenían la muestra sanguínea se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente, con una pipeta automática se transfirió el plasma a tubos criogénicos, los cuales fueron almacenados en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

VI.2.2 Proceso de extracción con solventes orgánicos

En tubos de cultivo de 10 ml se transfirieron 2 ml de plasma y se fortificaron con 50 µl de BPC 141 C¹³ (1 ppm, EC_1426_3, Cambridge Isotope Laboratories) como estándar interno. Se dejaron reposar a temperatura de 16 °C durante 24 h. Pasado este tiempo se agregaron 0.5 ml de ácido fórmico (J.T. Baker) y 3 ml de alcohol isopropílico (Burdick & Jackson) a cada tubo y se agitaron con vórtex durante 3 min.

Posteriormente se añadieron 3 ml de una mezcla éter etílico/hexano (1:1 v/v, J.T. Baker/J.T. Baker) y se invirtieron por 3 min para a continuación centrifugar a 3000 rpm durante 3 min. Una vez centrifugado, la fase orgánica (fase superior) se transfirió a otro tubo de cultivo y se le agregaron 2 ml de KCl (1%, J.T. Baker) se invirtió durante 3 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. Nuevamente se recolectó la fase orgánica colocándola en un tubo cónico de 15 ml previamente etiquetado y pesado. Este proceso se repitió 2 veces más. Subsiguientemente se evaporó con flujo de nitrógeno (Alta pureza 99.997%, INFRA) a 37 °C hasta llegar a peso constante. El contenido de lípidos se determinó por gravimetría.

Los lípidos obtenidos se disolvieron en 3 ml de hexano (J.T. Baker) y se transfirieron a un tubo de cultivo, en el cual se adicionaron 2 ml de ácido sulfúrico (J.T. Baker), se invirtió durante 2 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. Se recuperó la fase superior en un tubo cónico y a la fase inferior se le extrajo 2 veces más con 3 ml de hexano. Los extractos colectados en el tubo cónico se evaporaron con flujo de nitrógeno a 37 °C hasta llegar a un volumen de 2 ml.

Finalmente, la muestra se filtró con un cartucho de Florisil (J.T. Baker) previamente acondicionado con 3 ml acetona (Meyer) y 3 ml hexano. Para eluir se adicionaron 6 ml de hexano; el eluato se recuperó en otro tubo cónico y se evaporó con flujo de nitrógeno a 37 °C hasta obtener un volumen de 100 µl, para así transferirlos con ayuda de una pipeta Pasteur al inserto, aforando con hexano a 150 µl.

VI.2.2 Análisis cromatográfico

El análisis cuantitativo se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer Clarus 500 acoplado a un espectrómetro de masas marca Perkin Elmer Clarus 560S. Se utilizó una columna, Elite-5 MS 30 m x 0.32 ID, 0.25 µm de espesor de película. Las temperaturas del horno fueron las siguientes: inicial 100 °C (2 min), final 310 °C durante 6 min (rampas: 20 °C/min hasta 200 °C, 7 °C/min hasta 270 °C/min, 15 °C/min hasta 310 °C), la temperatura del inyector fue 275 °C con splitless de 30 ml/min, línea de transferencia de 280 °C y el detector de masa de 230 °C. Se empleó helio (INFRA) como gas acarreador a una velocidad lineal de 1.5 ml/min.

VI.3 Química sanguínea parcial y citometría hemática

La determinación de estos parámetros se realizó en colaboración con el laboratorio de análisis clínicos La Paz. Para la cuantificación de glucosa, urea, nitrógeno ureico y creatinina se utilizó un espectrofotómetro marca Pointe 180 modelo 1907 y para determinar los parámetros de la citometría hemática (leucocitos totales, eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular

media, concentración media de hemoglobina corpuscular y plaquetas, se empleó un equipo Coulter T890 (Hematology System, SIEMENS).

VI.3.1 Diferencial de leucocitos

En portaobjetos previamente lavados y desengrasados se colocaron 10 µl de sangre, se realizó un frotis y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para cada individuo se realizaron 2 laminillas. Posteriormente las laminillas se colocaron en un puente de tinción con colorante de Wrigth (HYCEL) durante 5 min. Transcurrido el tiempo se les agrego buffer 6.4 (HYCEL) durante 5 min. Finalizado el tiempo las laminillas se lavaron con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron hasta su análisis.

VI.3.1.1 Recuento diferencial de leucocitos

El análisis se realizó en un microscopio óptico Marca Zeiiss con objetivo de 100x. La cuenta absoluta de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se contabilizó en 100 leucocitos por individuo. (Figura 8).

Neutrófilo segmentado

- Tiene un núcleo que presenta condensación de cromatina y espacios claramente definidos de paracromatina. Se colorea fuertemente y adquiere formas irregulares similares a las letras E, Z y S.
- Está formado por varios lóbulos (hasta 4) unidos por puentes de cromatina.
- El citoplasma es incoloro y presenta gránulos pequeños

Neutrófilo en banda

- Su cromatina nuclear no está dividida.
- Núcleo condensado que puede presentar una o dos constricciones.
- El citoplasma presenta gránulos y coloración ligeramente rosada.
- Membrana celular lisa.

Linfocito

- Tiene un solo núcleo bien definido con bloques de cromatina que se tiñe de azul oscuro.
- El citoplasma es abundante, azul pálido y puede contener gránulos azurófilos inespecíficos.

Monocito

- Su núcleo es generalmente excéntrico, aunque puede ser central, con forma arriñonada o lobulada, aunque puede tener forma de bastón
- Su cromatina nuclear es laxa.
- El citoplasma es amplio de color gris y puede presentar gránulos inespecíficos.

Eosinófilo

- El núcleo es bilobulado y lo que más caracteriza a esta célula es la presencia de gránulos color naranja marrón.
- El citoplasma es incoloro.

Basófilo

- El núcleo es poco segmentado.
- Presenta gránulos de color púrpura negruzco.

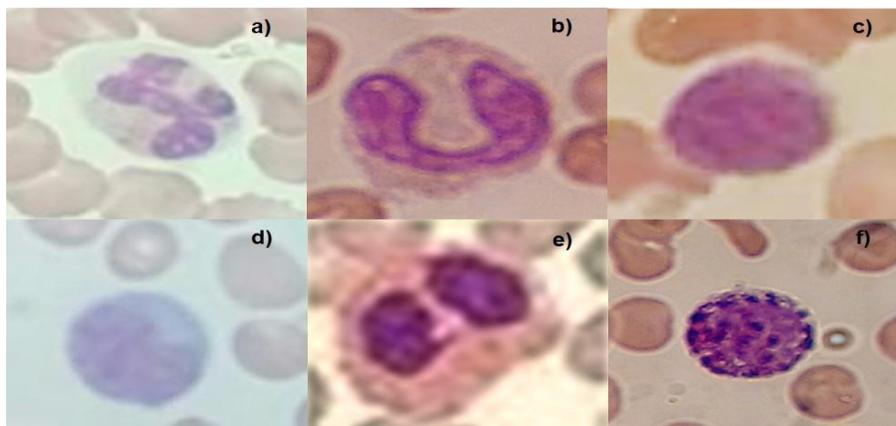


Figura 8. Células analizadas en el diferencial de leucocitos. a) Neutrófilo segmentado, b) Neutrófilo en banda, c) Linfocito, d) Monocito, e) Eosinófilo y f) Basófilo. (Fuente propia).

VI.4 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis

VI.4.1 Siembra de las muestras de sangre

La siembra se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. En tubos Falcón de 15 ml estériles se adicionaron 6.3 ml de medio RPMI-1640 suplementado con L-Glutamina (SIGMA, #R6504) y bicarbonato de sodio al 2 % (J.T. Baker), 200 µl de Fitohemaglutinina-M (Sigma, #L8902, 1mg/ml), 10 µl de antibiótico (Penicilina 5,000 U, Estreptomina 5 mg y Neomicina 10 mg/ml, SIGMA) y 0.5 ml de sangre. Cada tubo se mezcló suavemente por inversión, se colocaron en una gradilla y se incubaron a 37 °C durante 48 h.

VI.4.2 Bloqueo de citocinesis

Pasado este tiempo, para bloquear la citocinesis de los linfocitos, se agregaron 10 µl de Citocalasina-B (3 mg/ml, SIGMA) a cada tubo. Se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron a 37 °C por 24 h.

VI.4.3 Fijación y obtención de linfocitos

Se preparó una solución de metanol-ácido acético (3:1 v/v, J.T. Baker / J.T. Baker), que se introdujo al refrigerador (4 °C) por al menos una hora antes de cosechar y se mantuvo sobre una fuente de hielo al momento de utilizarlo.

Finalizado el tiempo de cultivo los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml del precipitado. La muestra se resuspendió en un vórtex y al mismo tiempo se agregaron suavemente 5 ml de la solución previamente preparada. Nuevamente se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El proceso se repitió 4 veces, en el último lavado se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml de la suspensión celular.

VI.4.4 Preparación y tinción de laminillas

Los portaobjetos se rotularon, se colocaron en agua destilada y fueron llevados al refrigerador (4 °C) por al menos una hora antes de cosechar, para asegurarse de que al usarlos estuvieran completamente fríos.

Al finalizar el proceso de lavado, con una pipeta Pasteur se resuspendió el botón de células, se aspiró completamente la suspensión y se vertió por goteo a distancia (30 cm) sobre un portaobjetos previamente preparado, esparciendo las células por toda la superficie. Se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Para la tinción las laminillas se colocaron en un frasco Coplin que contenía eosina B (SIGMA), durante 1 min, se escurrieron rápidamente en posición vertical sobre papel absorbente para quitar el excedente e inmediatamente se introdujeron en otro Coplin con azul de metileno (SIGMA) durante 1 min. Finalmente se lavaron con agua destilada y se secaron al ambiente.

VI.4.5 Análisis microscópico de anomalías nucleares

Se realizó la lectura en un microscopio óptico Marca Zeiss con objetivo de 100x. Para cada evento, se consideraron las características descritas a continuación:

Índice de División Nuclear (IDN)

Se contaron 500 células (por duplicado) mono, bi, tri y tetranucleadas para calcular el índice de división nuclear de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IDN = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)/N$$

Donde:

M_1 a M_4 = representan el número de células con 1 a 4 núcleos

N = es el número total de células viables evaluadas

Las células mono, bi, tri y tetranucleadas son células viables con un citoplasma intacto y núcleo morfológicamente normal. En el caso de las binucleadas pueden contener uno o más micronúcleos, núcleos lobulados o puentes de cromatina (Figura 9).

Citotoxicidad

En 500 células (por duplicado) se contabiliza la frecuencia de células apoptóticas y necróticas (Figura 9), considerando los siguientes criterios:

- Las células apoptóticas tempranas presentan condensación de la cromatina dentro del núcleo, y los límites citoplasmáticos y nucleares se encuentran intactos.
- Las células apoptóticas tardías tienen fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños dentro de un citoplasma y membrana citoplasmática intactos.
- Los fragmentos nucleares y el citoplasma presentan mayor intensidad de la tinción que en las células viables.

Para las células necróticas:

- Las células necróticas tempranas presentan un citoplasma pálido, numerosas vacuolas (principalmente en el citoplasma y a veces en el núcleo), la membrana citoplasmática dañada y un núcleo casi intacto.
- Las células necróticas tardías muestran pérdida y daño de citoplasma, membrana nuclear irregular con sólo una estructura nuclear parcialmente intacta a menudo con escape de material nuclear desde el límite nuclear.
- La intensidad de la tinción del núcleo y el citoplasma es generalmente menor que la observada en las células viables.

Genotoxicidad

Se evaluaron MN, NL y PC (Figura 9) en 1000 células binucleadas (por duplicado), para las cuales se consideraron las siguientes características: los dos núcleos en una célula deben tener membranas nucleares intactas y encontrarse dentro del

mismo límite citoplasmático. Los dos núcleos deben ser aproximadamente iguales en tamaño, intensidad y patrón de tinción. Los dos núcleos principales de una célula BI pueden tocarse pero idealmente no deben superponerse entre sí. La membrana de una célula BI debe estar intacta y claramente distinguible del límite citoplásmico de células adyacentes.

Criterios para MN

- El diámetro del MN oscila entre $1/16$ - $1/3$ de la media del diámetro del núcleo principal, lo que corresponde a $1/256$ y $1/9$ de la superficie de uno de los núcleos principales en una célula BI, respectivamente.
- Los MN son no refractarios.
- La intensidad de tinción de los MN es similar a los núcleos principales.
- Los MN no están conectados con ninguno de los núcleos principales.
- Los MN pueden tocar pero no solaparse con los núcleos de la célula binucleada.

Criterios para NL

- Los NL son similares a los MN en apariencia con la excepción de que están conectados con el núcleo principal a través de un puente que puede ser ligeramente más estrecho que el diámetro del brote o por un puente mucho más delgado dependiendo de la etapa del proceso de extrusión.
- Los NL tienen la misma intensidad de tinción que los MN.

Criterios para PC

- La anchura de un PC puede variar considerablemente, pero usualmente no excede $1/4$ del diámetro de los núcleos principales de la célula.
- Los PC deben tener las mismas características de tinción que los núcleos principales.
- Puede observarse más de un PC dentro de una célula binucleada.
- Una célula BI con un PC puede contener uno o más MN.

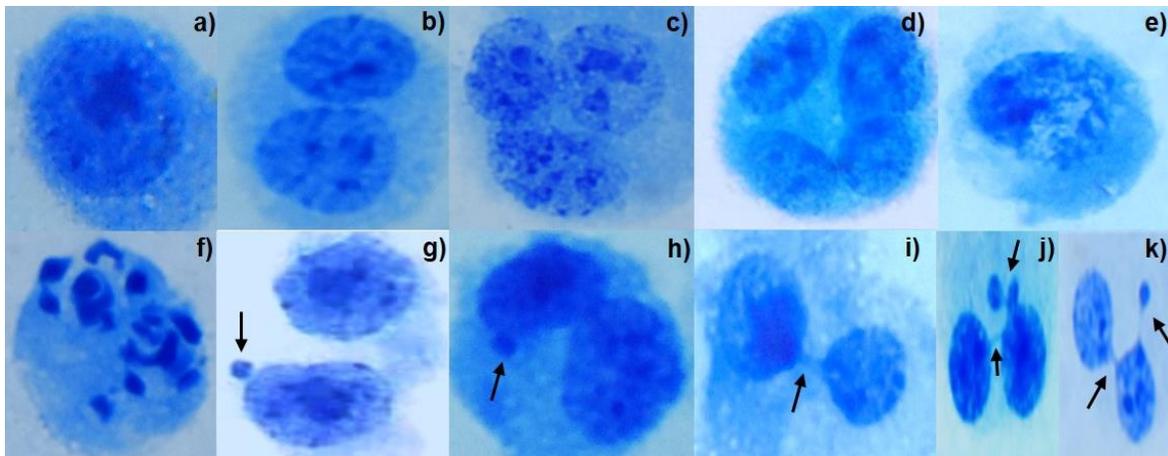


Figura 9. Células y anomalías nucleares evaluadas en el ensayo de micronúcleos. a) célula mononucleada, b) célula binucleada, c) célula trinucleada, d) célula tetranucleada, e) célula en necrosis, f) célula en apoptosis, g) célula binucleada con un micronúcleo, h) célula con núcleo lobulado, i) célula con puente de cromatina, j) y k) células con núcleo lobulado y puente de cromatina (Fuente propia).

VI.5 Ensayo cometa en sangre total

VI.5.1 Preparación de laminillas con agarosa

En portaobjetos (CORNING) se agregó 150 μ l de Agarosa Regular (AR) (SIGMA) al 0.5%, extendiéndose con el dedo índice libre de grasa, se solidificaron a temperatura ambiente y se guardaron hasta su uso.

VI.5.2 Montaje de la muestra de sangre sobre las laminillas

Se colocó en un tubo eppendorf 15 μ l de sangre total y se mezcló con 225 μ l de Agarosa de Bajo Punto de Fusión (ABPF) (SIGMA) al 0.5%, se añadieron 75 μ l de la mezcla sobre los portaobjetos previamente preparados con AR, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó solidificar a 4 °C, posteriormente se retiró el cubreobjetos y se aplicó una segunda capa de ABPF, una vez solidificadas, las laminillas se colocaron en una caja Coplin con solución de lisis (NaCl 2.5 M, Trizma base 10 mM, EDTA 100 mM, NaOH 0.3 M, DMSO 10 % y Tritón X-100 1%, pH 10) y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) durante 24 h.

VI.5.3 Desenrollamiento y electroforesis

Se colocaron las laminillas de forma horizontal en una cámara de electroforesis marca Thermo OWL EASYCAST B2 que contenía amortiguador de electroforesis frío (4 °C) recién elaborado (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM, pH 13) durante 20 min para permitir el desenrollamiento del ADN; pasado este tiempo se aplicó una corriente de 25 V y 300 mA con una fuente de poder marca Bio-Rad modelo PowerPac Basic durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, las laminillas se neutralizaron lavándolas tres veces en amortiguador de neutralización (Trizma base 0.4 M, pH 7.5) durante 5 min cada vez, posteriormente se lavaron con 5 ml de agua desionizada tres veces durante 5 min cada vez. Finalmente, se sumergieron en metanol durante 5 min, transcurrido el tiempo, se colocaron sobre papel absorbente y secaron a temperatura ambiente.

VI.5.4 Análisis microscópico de las moléculas de ADN

Las laminillas se tiñeron con 30 µl de bromuro de etidio (SIGMA) al 0.02% y se observaron en un microscopio de epifluorescencia marca Leica Modelo DM2000 a 40X. Se realizó el conteo y clasificación visual recomendado por Collins (2004).

Se contaron 100 moléculas de ADN (por duplicado) las cuales se agruparon por categorías o clases de daño (Miyaji *et al.*, 2004) (Figura 10).

- a) Clase 0: ADN no fragmentado, sin cola.
- b) Clase 1: Longitud de la cauda menor al diámetro de la cabeza.
- c) Clase 2: Longitud de la cauda entre una y dos veces el diámetro de la cabeza.
- d) Clase 3: Longitud de la cauda mayor al doble del diámetro de la cabeza.

La puntuación de daño se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Puntuación de daño} = (0Xn_0) + (1Xn_1) + (2Xn_2) + (3Xn_3)$$

Donde:

n = número de moléculas de ADN en cada una de las categorías.

0 a 3 = números de cada categoría.

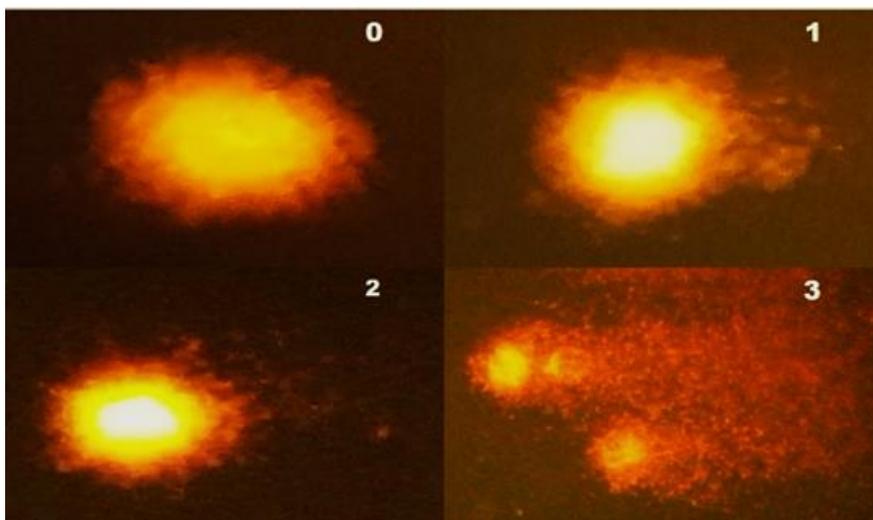


Figura 10. Clasificación de las moléculas de ADN de células mononucleares en el ensayo cometa. Los números indican la clase de daño que representan (Fuente propia).

VI.6 Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante un análisis estadístico paramétrico, empleando la prueba T-Student, para comparar los parámetros antropométricos y sanguíneos de la población expuesta con la de referencia. La comparación de la frecuencia de división nuclear, índice de división nuclear, cito y genotoxicidad entre grupos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Para determinar la asociación entre los niveles de los COP presentes en plasma sanguíneo y las variables de genotoxicidad, se realizaron correlaciones lineales de Pearson. Posteriormente, en las variables que presentaron mayor significancia se realizó una regresión lineal simple.

Los análisis anteriores se realizaron con el programa SigmaPlot versión 11.0.

VII. RESULTADOS

VII.1 Caracterización de la población de estudio

La Tabla I muestra la media y desviación estándar de la edad y los parámetros antropométricos determinados en los 75 individuos evaluados en el estudio. El porcentaje de mujeres participantes fue mayor en ambos grupos (alrededor del 60 %). En cuanto al IMC, se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en las mujeres del grupo expuesto respecto al de referencia. Sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2017), el IMC adecuado para el género femenino en el rango de edad de 15-18 años es menor a 24 kg/m^2 y los valores de ambos grupos están por debajo de dicho valor por lo que, no presentan sobrepeso.

Tabla I. Parámetros antropométricos de la población de estudio

	Género	n	Edad (años)	Altura (m)	Peso (kg)	IMC (kg/m²)
Tex	Fem	18	17.4 ± 0.7	1.6 ± 0.1	56.9 ± 9.5	$22.8 \pm 3.8^*$
	Mas	12	17.2 ± 0.4	1.7 ± 0.1	62.1 ± 17.0	21.3 ± 5.1
Hui	Fem	29	16.0 ± 0.8	1.6 ± 0.1	50.7 ± 10.8	21.0 ± 4.0
	Mas	16	16.9 ± 1.3	1.7 ± 0.1	60.8 ± 11.1	21.1 ± 3.1

n=número de individuos. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba T-Student.

La información obtenida sobre las fuentes de contaminación en las zonas de estudio indicó que, un mayor porcentaje de la población del grupo de referencia vive cerca de zonas agrícolas y solo dos individuos de Texcalac viven cerca de la zona industrial (Tabla II). Con respecto a los hábitos domésticos, el grupo de referencia muestra el porcentaje más alto en el uso de utensilios de barro para la preparación de alimentos, así como, en el consumo de agua de grifo (Tabla III).

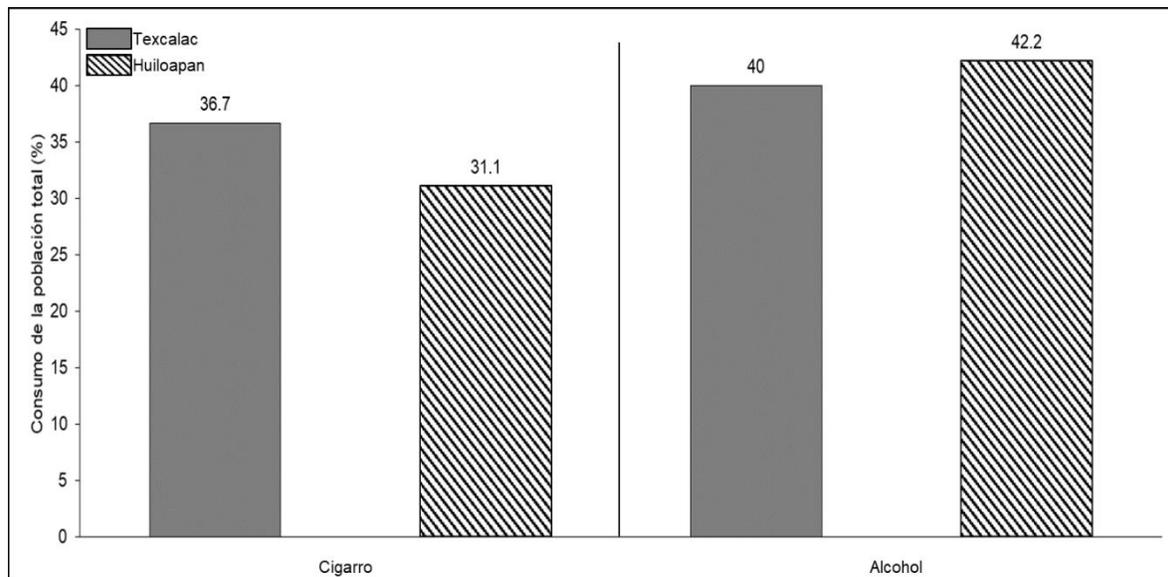
Tabla II. Porcentaje de la población asociada a fuentes de contaminación

	Zona agrícola < 500 m	Zona industrial < 500 m	Trabaja en alfarería
Tex	23.3	7.0	0.0
Hui	37.7	0.0	0.0

Tabla III. Hábitos domésticos de ambos grupos de estudio (%)

	Alimentos cocinados en utensilios de barro	Consumo de agua de grifo	Alimentos cocinados con agua de grifo
Tex	76.7	16.7	60.0
Hui	91.1	40	56.6

Alrededor de la tercera parte de los individuos de ambos grupos tienen el hábito de fumar. De la población que fuma; el 16.3 % del grupo de Texcalac fuman de 4 a 12 cigarrillos al mes, mientras que, el 9.6 % del grupo de Huiloapan fuma de 60 a 120 cigarrillos al mes. La frecuencia de la población que consume alcohol es similar en ambos grupos; el 17.5 % de los individuos de Texcalac que ingieren bebidas alcohólicas consume con una frecuencia de 1 a 3 veces al mes, en comparación con el 33.1 % del grupo de referencia que consume solo 1 vez al mes (Gráfica 1).



Gráfica 1. Consumo de sustancias psicoactivas de ambos grupos de estudio.

De acuerdo a la información obtenida sobre los hábitos alimenticios de la población (Tabla IV), el consumo de frutas y verduras es similar en ambos grupos. Sin embargo, la frecuencia de consumo es mayor en el grupo de referencia, donde el 57.7 y 31.1 % consumen más de cuatro veces por semana frutas y verduras, respectivamente. Por otro lado, la ingesta de alimentos enlatados y de refrescos es ligeramente menor en el grupo de referencia, aunque el 42.2 % de esta población lo consume con mayor frecuencia (2-4 veces por semana).

Tabla IV. Consumo alimentario por grupo de alimentos de ambas poblaciones de estudio

	Consumo	Población total (%)	Frecuencia semanal		
			1	2 – 4	> 4
Tex	Carne	100	4	20	6
	Frutas	100	7	10	13
	Verduras	100	8	14	8
	Cereales	100	6	16	8
	Legumbres	97	8	14	7
	Enlatados	93	24	4	0
	Embutidos	93	13	14	1
	Refrescos	100	15	11	4
Hui	Carne	100	11	28	6
	Frutas	100	2	17	26
	Verduras	100	6	25	14
	Cereales	100	5	25	16
	Legumbres	100	9	26	10
	Enlatados	89	30	10	0
	Embutidos	98	24	16	4
	Refrescos	96	16	19	8

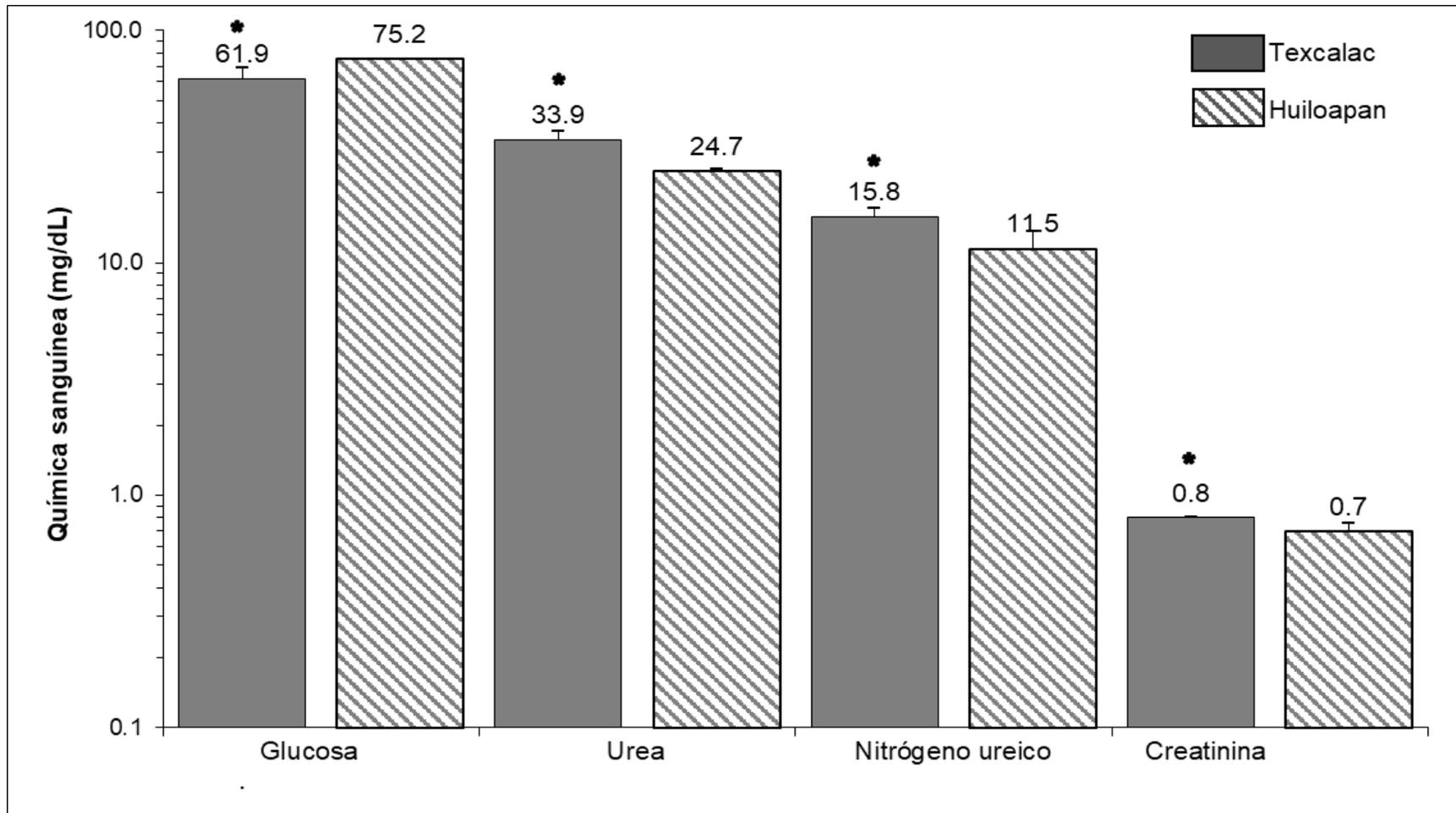
VII.2 Química sanguínea parcial y citometría hemática

Los resultados de la química sanguínea (glucosa, urea, nitrógeno ureico y creatinina) del grupo expuesto y de referencia mostraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre grupos, para el caso del género femenino (Gráfica 2) en los cuatro parámetros, mientras que para el masculino (Gráfica 3), solo en glucosa, urea y nitrógeno ureico. De estos parámetros, la glucosa presentó valores mayores en el grupo de referencia para ambos géneros, con un intervalo que osciló de 52.3 a 83.3 mg/dL y 62.0 a 91.2 mg/dL para mujeres y hombres, respectivamente. En el resto de los parámetros, los valores fueron mayores en el grupo expuesto.

Por otro lado, los resultados de la citometría hemática del grupo expuesto y de referencia solo presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en tres parámetros correspondientes a la fórmula roja, para el caso del género femenino (Gráfica 4), concentración media de hemoglobina y concentración media de hemoglobina corpuscular, además de estos, el porcentaje del hematocrito para el género masculino (Gráfica 5). En cuanto a la fórmula plaquetaria los valores oscilaron de 169.0 a 411.0 mil/ μ L y de 131.0 a 346.0 mil/ μ L para mujeres y hombres, respectivamente. En relación a la fórmula blanca, el porcentaje de leucocitos totales fluctuó de 4.0 a 12.0 % y de 3.4 a 11.1 % para mujeres y hombres, respectivamente.

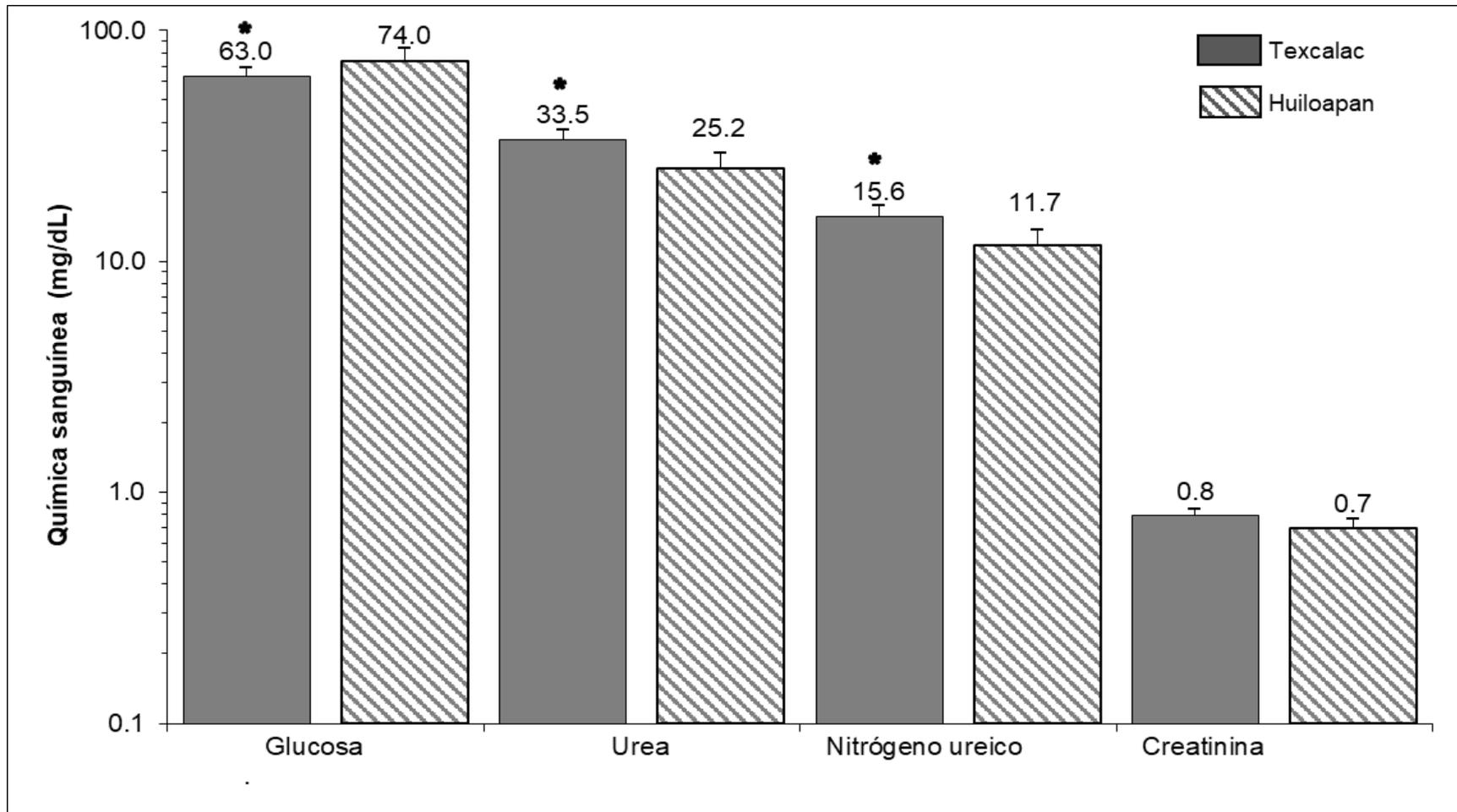
En cuanto a los resultados de los diferenciales de fórmula blanca, la Tabla V, muestra la media y desviación estándar para cada uno de los parámetros analizados en ambos grupos. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) en neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda, monocitos y linfocitos en la población masculina, de los cuales, los neutrófilos en banda presentaron valores menores en el grupo expuesto, mientras que los valores fueron mayores en los linfocitos.

Cabe resaltar que, a pesar de las diferencias significativas que se presentaron, todos los resultados correspondientes a los análisis clínicos se encuentran dentro de los valores de referencia establecidos por el laboratorio La Paz.



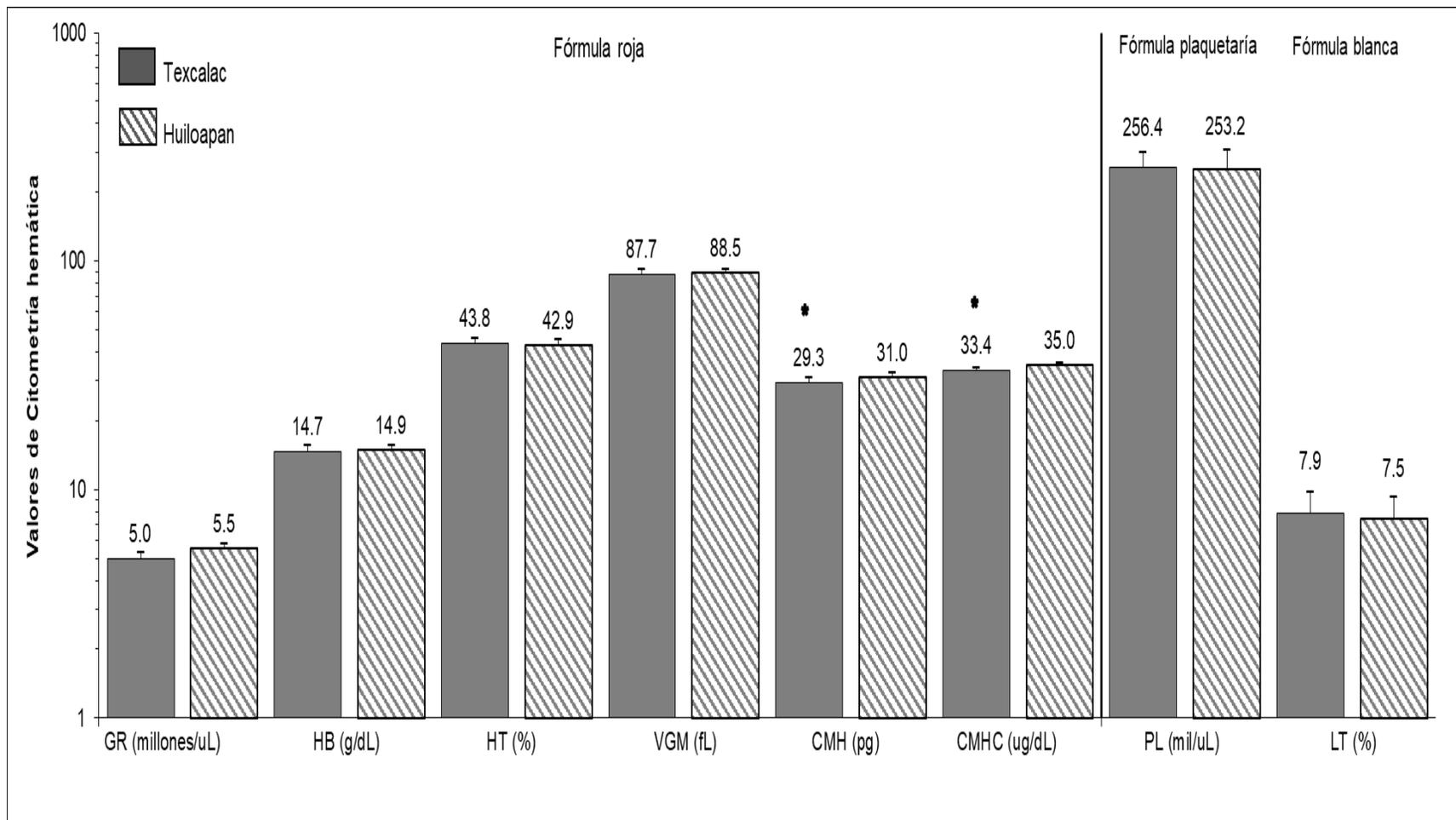
*Diferencia significativa ($p < 0.001$) de acuerdo con la prueba T-Student.

Gráfica 2. Comparación de parámetros sanguíneos entre mujeres del grupo expuesto y el grupo de referencia.



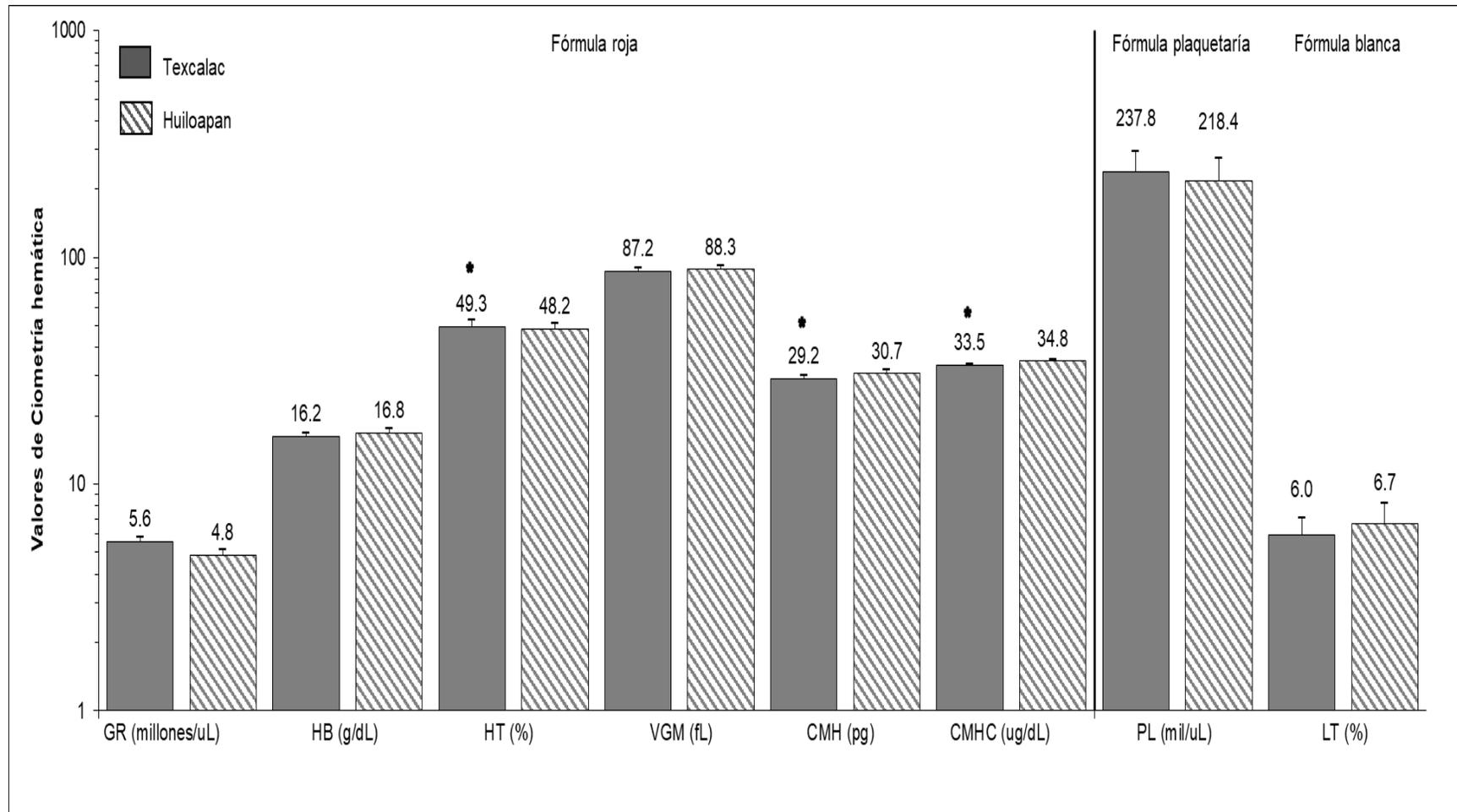
*Diferencia significativa ($p < 0.001$) de acuerdo con la prueba T-Student.

Gráfica 3. Comparación de parámetros sanguíneos entre hombres del grupo expuesto y el grupo de referencia.



Globulos rojos (GR), Hemoglobina (HB), Hematócrito (HT), Volumen globular medio (VGM), Concentración media de hemoglobina (CMH), Concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC), Plaquetas (PL) y Leucocitos totales (LT). *Diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba T-Student

Gráfica 4. Comparación de parámetros citométricos sanguíneos entre mujeres del grupo expuesto y el grupo de referencia.



Globulos rojos (GR), Hemoglobina (HB), Hematócrito (HT), Volumen globular medio (VGM), Concentración media de hemoglobina (CMH), Concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC), Plaquetas (PL) y Leucocitos totales (LT). *Diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba T-Student.

Gráfica 5. Comparación de parámetros citometricos sanguíneos entre hombres del grupo expuesto y el grupo de referencia.

Tabla V. Comparación de los diferenciales de fórmula blanca entre el grupo expuesto y el grupo de referencia.

		Neutrófilo Segmentado	Neutrófilo Banda	Eosinófilos	Basófilos	Monocitos	Linfocitos
		M ± DS	M ± DS	M ± DS	M ± DS	M ± DS	M ± DS
TEX	FEM	46.0 ± 12.2	1.5 ± 1.6	0.7 ± 0.9	0.4 ± 0.5	2.4 ± 1.9	49.1 ± 12.0
	MAS	38.0 ± 7.3*	0.6 ± 0.9*	1.6 ± 1.2	0.4 ± 0.6	4.1 ± 1.9*	55.3 ± 7.7*
HUI	FEM	51.7 ± 8.9	0.7 ± 0.9	1.1 ± 1.3	0.4 ± 0.6	1.7 ± 1.5	44.4 ± 9.3
	MAS	45.9 ± 16.2	3.5 ± 9.2	1.5 ± 1.6	0.3 ± 0.4	1.9 ± 2.0	47.0 ± 11.5

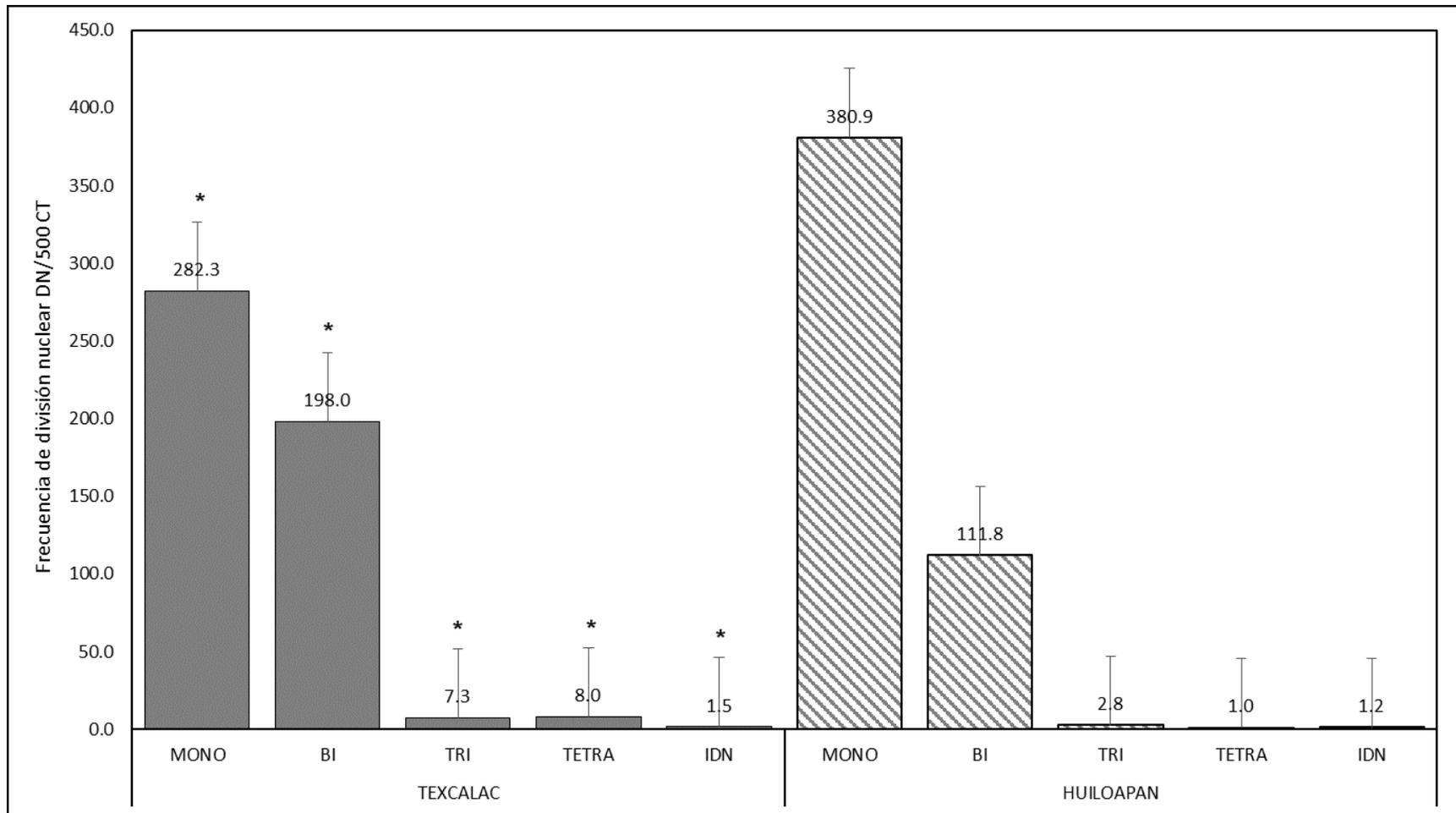
M=media, DS=desviación estándar. *Diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba T-Student.

VII.3 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis

El ensayo de micronúcleos con enfoque citoma permite evaluar índice de división nuclear, cito y genotoxicidad. Con respecto al efecto citostático e IDN en la Gráfica 6, se muestra la frecuencia de células viables, donde se observa una clara diferencia entre el grupo expuesto y el de referencia. Las células binucleadas presentaron una frecuencia menor en Huiloapan, mientras el valor mayor del IDN se presentó en Texcalac.

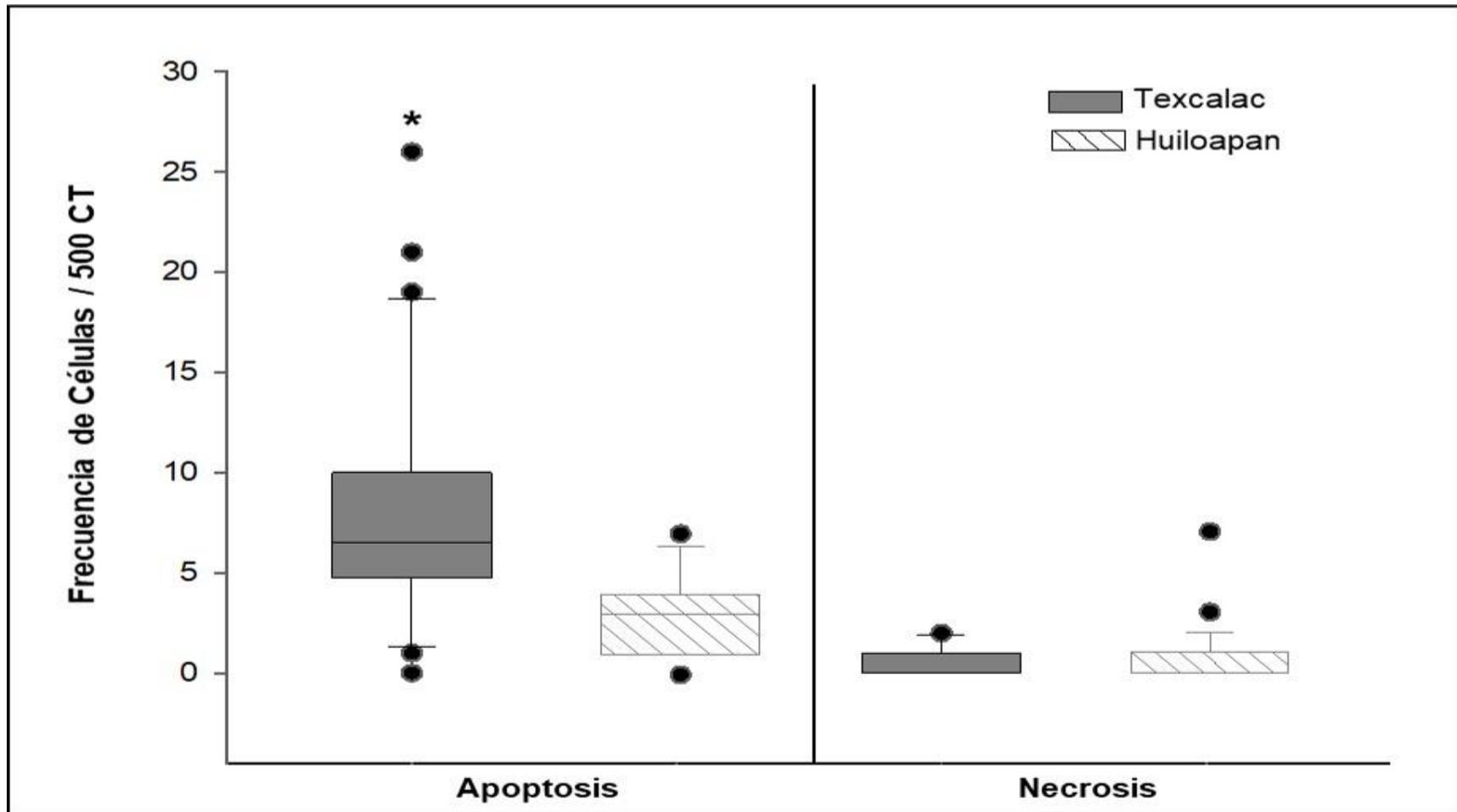
Por otro lado, los resultados obtenidos sobre la citotoxicidad (Gráfica 7), muestran diferencias significativas ($p < 0.001$) en las células apoptóticas, cuya frecuencia fue mayor en el grupo expuesto (6.5 ± 2.5 vs 4.5 ± 0.8 FC/500 CT, Texcalac y Huiloapan, respectivamente). En cuanto a la necrosis, los valores fueron similares en ambos grupos de estudio.

Los resultados de genotoxicidad muestran diferencias significativas ($p < 0.001$) para las tres anormalidades evaluadas (MN, NL y PC) (Gráfica 8), donde el grupo expuesto presentó valores mayores, sobresaliendo el caso de los NL ya que la mediana fue alrededor de tres veces mayor al grupo de referencia (Mediana \pm Desviación cuartílica 8.0 ± 4.3 NL/1000 y 2.0 ± 0.9 NL/1000, grupo expuesto y referencia, respectivamente).



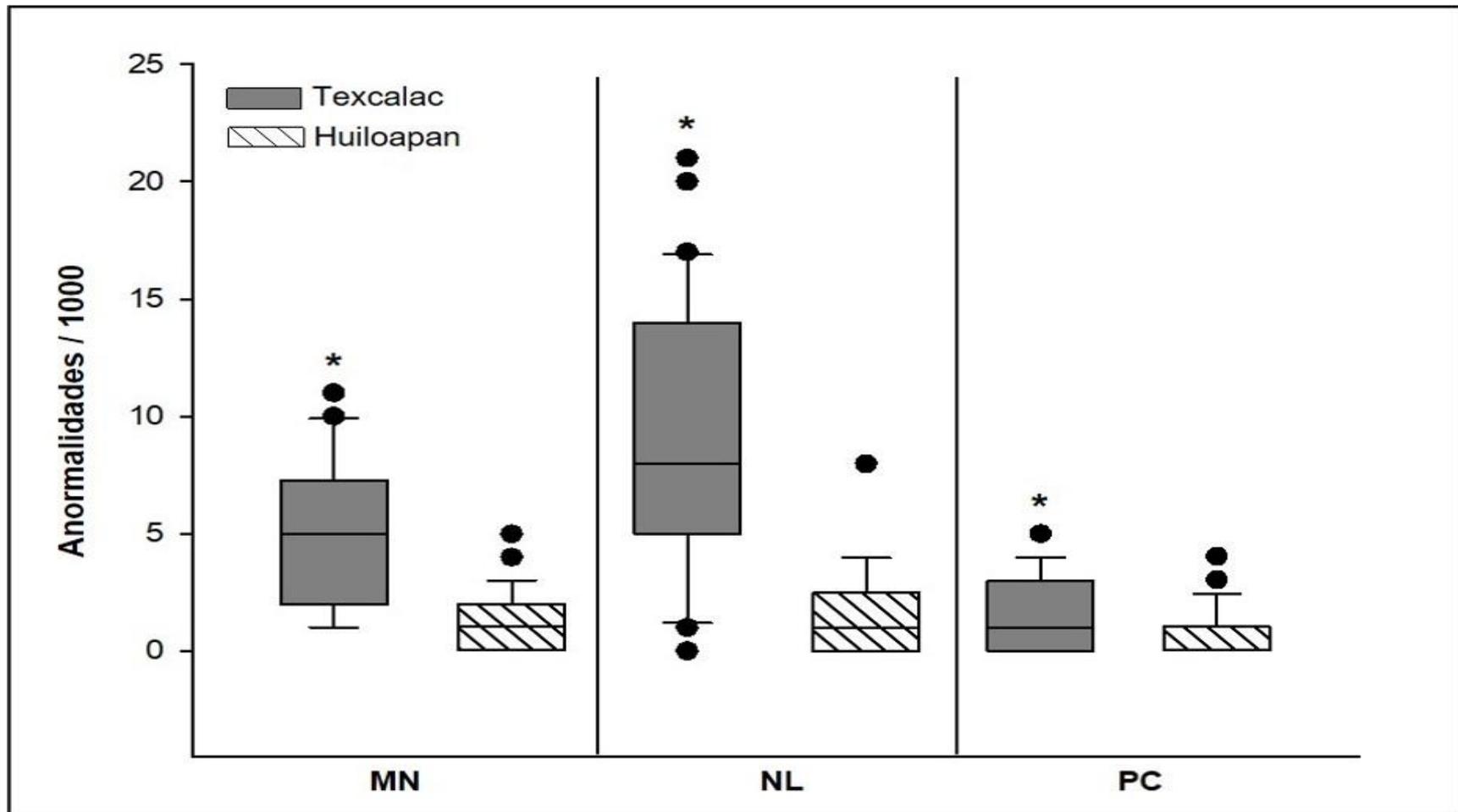
Mononucleadas (MONO), Binucleadas (BI), Trinucleadas (TRI), Tetrannucleadas (TETRA) e Índice de División Nuclear (IDN). *Diferencia significativa ($p < 0.001$) de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

Gráfica 6. Frecuencia de división nuclear e índice de división nuclear en el grupo expuesto y el grupo de referencia.



*Diferencia significativa ($p < 0.001$) de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

Gráfica 7. Comparación de la citotoxicidad entre el grupo expuesto y de referencia.

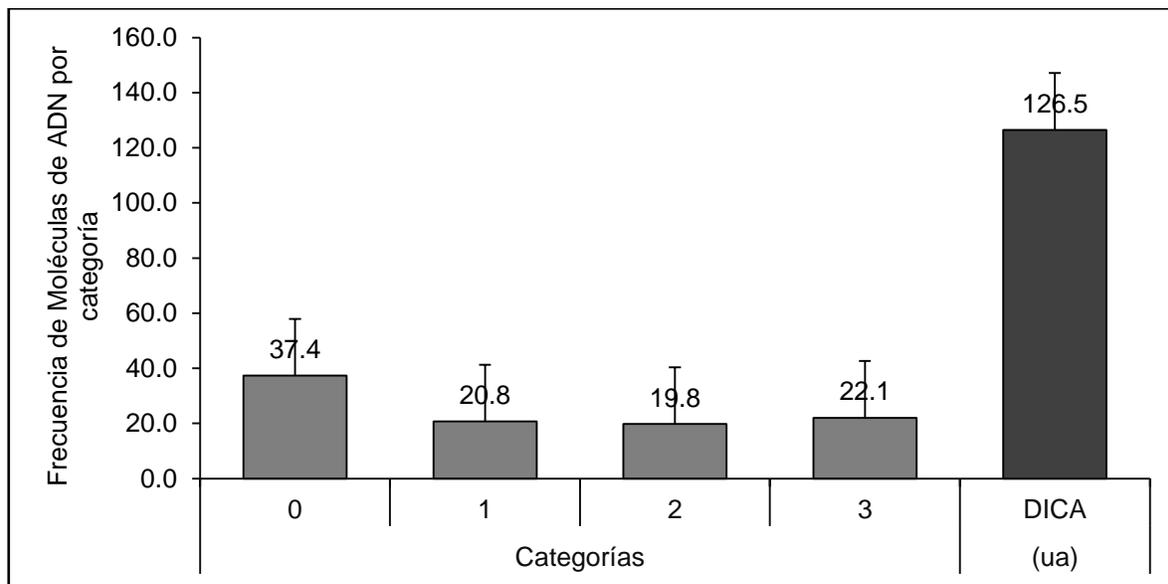


Micronúcleos (MN), Núcleos Lobulados (NL) y Puentes de Cromatina (PC). *Diferencia significativa ($p < 0.001$) de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

Gráfica 8. Genotoxicidad del grupo expuesto y de referencia.

VII.4 Ensayo cometa

La genotoxicidad por ensayo cometa fue evaluada solamente en 16 individuos del grupo expuesto, en la Gráfica 9, se muestra la media y desviación estándar de la clasificación e índice de daño al ADN por ensayo cometa (DICA) en las células mononucleares de sangre periférica. El valor del DICA se obtuvo al sumar el producto del número de moléculas de ADN en cada categoría por el número de la categoría, de tal forma que, entre mayor sea el número de moléculas que se encuentran en la categoría 3, el valor del DICA se incrementará hasta un máximo de 300 unidades arbitrarias (ua). Como se puede observar, en este grupo de individuos la media del DICA es de 126.5 ua.



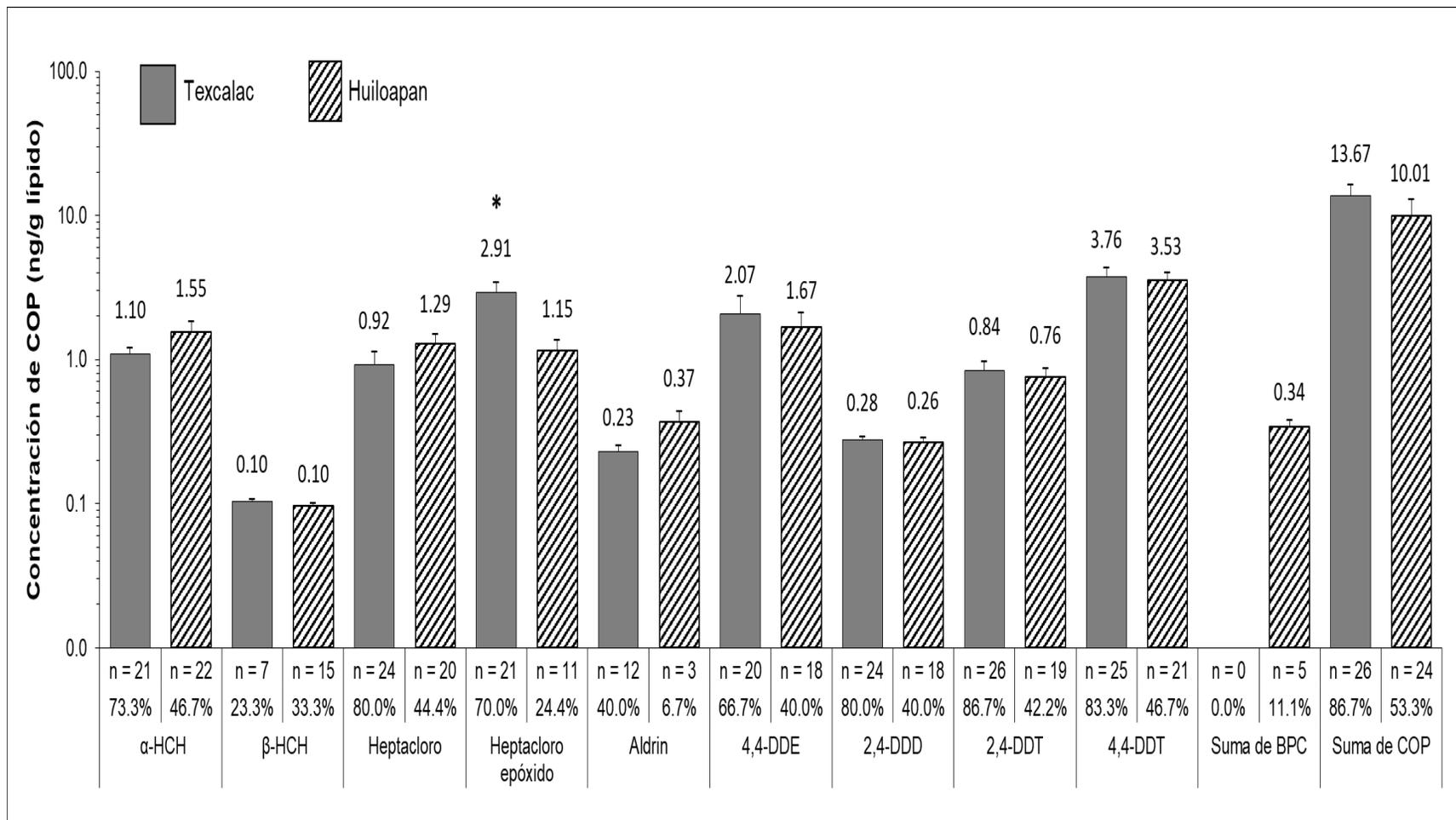
Gráfica 9. Frecuencia de moléculas de ADN por categoría de daño e Índice de daño por ensayo cometa (DICA) en individuos de Texcalac.

VII.5 Cuantificación de compuestos orgánicos persistentes por CGEM

Del total de individuos participantes en este estudio, solo en 26 del grupo expuesto y en 24 del de referencia se detectaron y cuantificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los siguientes COP: α -HCH (alfa-Hexaclorociclohexano), β -HCH (beta-Hexaclorociclohexano), heptacloro, aldrín, heptacloro epóxido, 4,4-DDE (4,4, Diclorodifenildicloroetileno), 2,4-DDD (2,4-Diclorodifenildicloroetano), 2,4-DDT (2,4- Diclorodifeniltricloroetano), 4,4-DDT (4,4-Diclorodifeniltricloroetano) y cuatro congéneres de BPC (17, 28, 44 y 74), los cuales se agrupan y presentan como la suma de BPC.

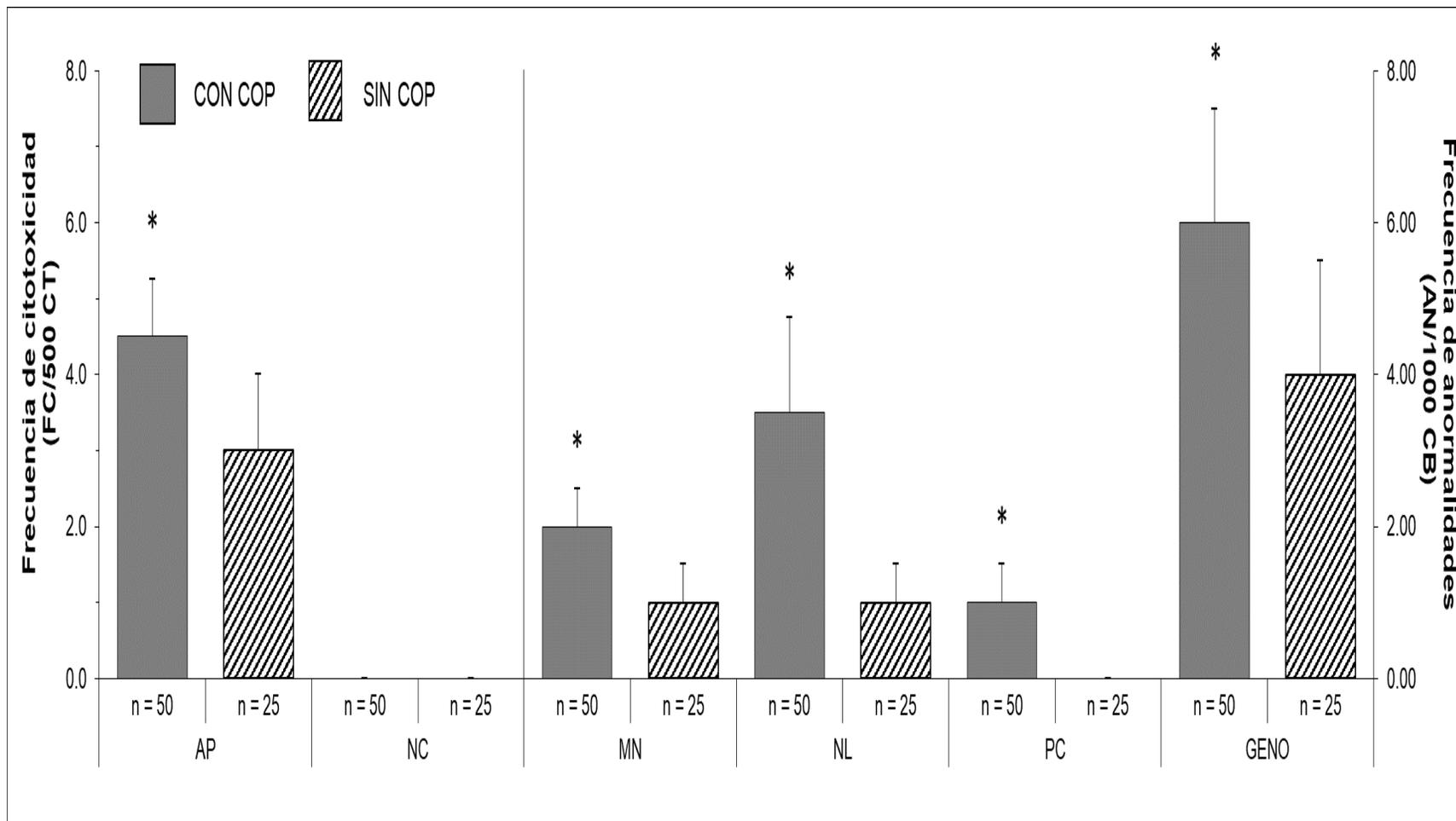
Los resultados de los niveles de COP en plasma de ambos grupos se presentan en la Gráfica 10 como medianas y desviación cuartílica. Se puede observar que en general, las concentraciones son muy similares en ambos grupos, sin embargo, el porcentaje de la población en la cual fueron detectados y cuantificados, fue mayor para el grupo expuesto donde la suma de los COP fue 86.7 %, mientras que en el grupo de referencia solo alcanzó el 53.3 %, encontrando diferencia significativa ($p < 0.05$) solo en el heptacloro epóxido. Respecto a los BPC, solo en el grupo de referencia se detectaron.

Por otra parte, en la Gráfica 11 se muestra la frecuencia de cito y genotoxicidad, en la población con y sin presencia de COP en plasma, se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) en todas las variables evaluadas con valores mayores en la población con COP en plasma, donde la genotoxicidad es claramente mayor al presentar valores de 6.0 ± 1.5 AN/1000 CB vs 4.0 ± 1.5 AN/1000 CB en la población con y sin COP, respectivamente.



n=número de individuos. α -HCH (alfa-Hexaclorociclohexano), β -HCH (beta-Hexaclorociclohexano), 4,4-DDE (4,4, Diclorodifenildicloroetileno), 2,4-DDD (2,4-Diclorodifenildicloroetano), 2,4-DDT (2,4- Diclorodifeniltricloroetano), 4,4-DDT (4,4- Diclorodifeniltricloroetano), suma de BPC (Suma de bifenilos policlorados), Suma COP (Suma de los COP). *Diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

Gráfica 10. Concentración de los COP en individuos de los grupos expuesto y de referencia.



AP (células apoptóticas), NC (células necróticas), MN (micronúcleos), NL (núcleos lobulados), PC (puentes de cromatina), GENO (genotoxicidad).
 *Diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

Gráfica 11. Comparación de la frecuencia de anomalías nucleares y la presencia de COP en la población total de estudio.

Para evaluar la asociación entre la concentración de los COP en plasma sanguíneo y las variables de cito y genotoxicidad se realizaron correlaciones lineales de Pearson con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, considerando ambos grupos de estudio. En la Tabla VI, se puede observar que de las variables de citotoxicidad, la apoptosis presentó una asociación positiva y significativa con el heptacloro ($p=0.017$), mientras que la necrosis se correlacionó positivamente con el 2,4-DDD ($p=0.017$), el 2,4-DDT ($p=0.035$) y el 4,4-DDT ($p=0.046$). En cuanto a las variables de genotoxicidad tanto MN como PC no presentaron correlación con ninguno de los COP. En cambio, los núcleos lobulados y la genotoxicidad total presentaron correlación significativa con el heptacloro epóxido ($p=0.001$ y $p=0.005$ respectivamente) y con la suma de los COP ($p=0.016$ y $p=0.028$ respectivamente).

En la Gráfica 12 se presentan las correlaciones entre la concentración de la suma total de los COP y la genotoxicidad de las variables que fueron significativas de la población de ambos grupos de estudio. Las anormalidades nucleares totales incrementaron conforme aumentó la concentración de la suma de los COP con un coeficiente de determinación de 10.33 %, (inciso a), este coeficiente aumentó a 12.44 % cuando se consideró solo los núcleos lobulados como variable de genotoxicidad (inciso b).

Al correlacionarse cada COP por separado se encontró que el heptacloro epóxido (Gráfica 13) presentó una mayor asociación positiva y significativa con la genotoxicidad total (inciso a) y particularmente con los núcleos lobulados (inciso b), donde el 23.66 % y el 30.37 % de la respuesta de daño cromosómico respondió a la concentración de heptacloro epóxido.

Se evaluaron las asociaciones entre las concentraciones de COP y las variables de efecto aplicando correlaciones lineales de Pearson a cada grupo de estudio. En el grupo de Huiloapan ninguna de las variables de cito y genotoxicidad mostraron asociación con la concentración de COP, por lo que se presentan solo los resultados de las correlaciones correspondientes al grupo de Texcalac (Tabla VII). Se puede

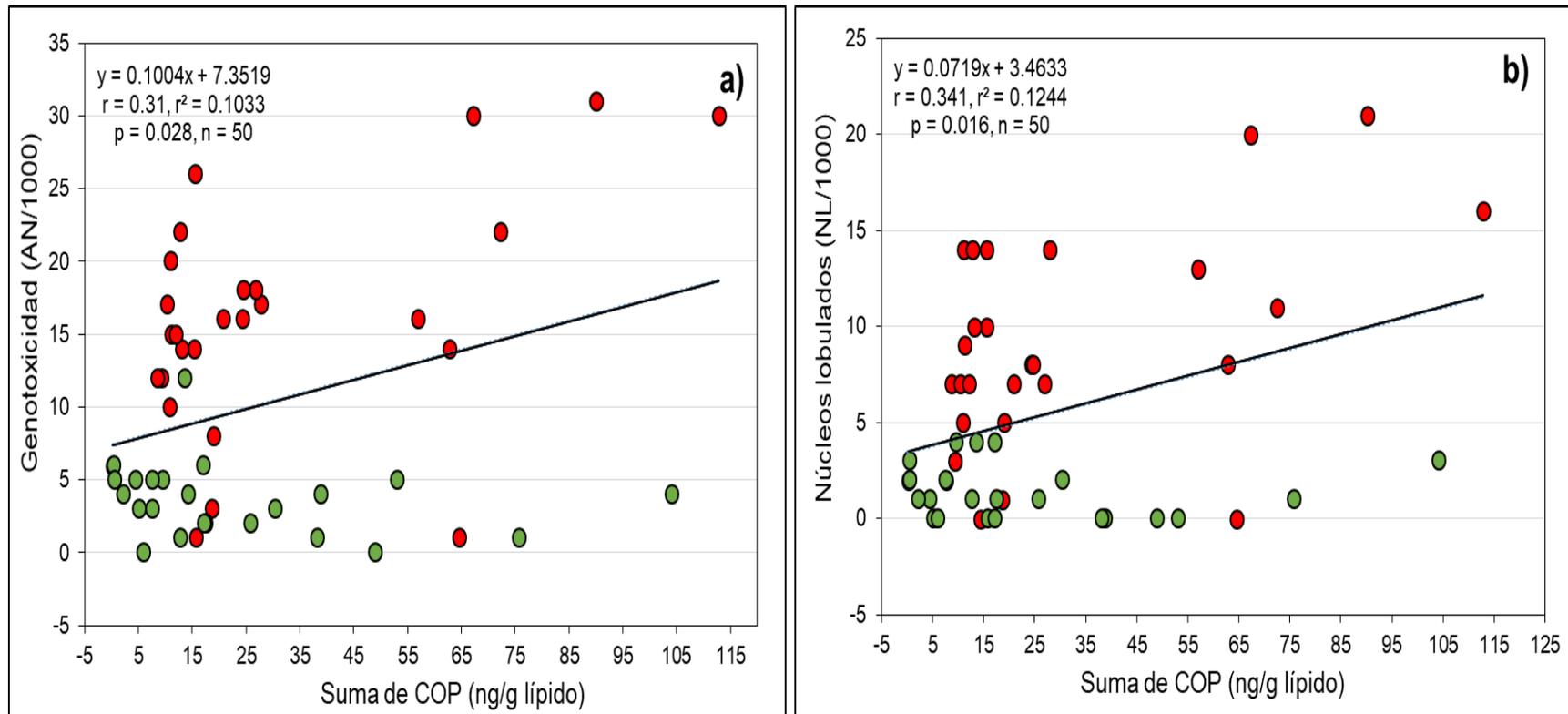
apreciar que la apoptosis tuvo una correlación significativa con el heptacloro ($p=0.009$) y que en las variables de genotoxicidad destaca la correlación significativa de los NL con el heptacloro epóxido ($p=0.044$), el 4,4-DDT ($p=0.041$) y la suma de los COP ($p=0.021$).

En las siguientes gráficas se presentan las regresiones lineales con los coeficientes de determinación y la p de Pearson de las variables que resultaron con mayor significancia. En la Gráfica 14 se muestra que la genotoxicidad total se asoció en un 22.4 % con la suma de COP (inciso a) y 27.8 % con la concentración de 4,4' DDT (inciso b). En la Gráfica 15 se presenta que la variable de genotoxicidad que mejor respondió a la suma de COP fue los NL con un coeficiente de determinación de 22.3 % y una significancia de $p = 0.021$ (inciso a), mientras que los COP que aportaron mayor significancia a la frecuencia de núcleos lobulados fueron el 4,4' DDT (inciso b) y el heptacloro epóxido (inciso c) con valores del coeficiente de determinación de $r^2 = 0.2474$ y $r^2 = 0.1975$, respectivamente, lo que indica que el 24.7 % y 19.7 % de la formación de NL puede ser inducido por estos COP.

Tabla VI. Correlación de Pearson entre los COP y las variables de citotoxicidad y genotoxicidad de ambos grupos de estudio

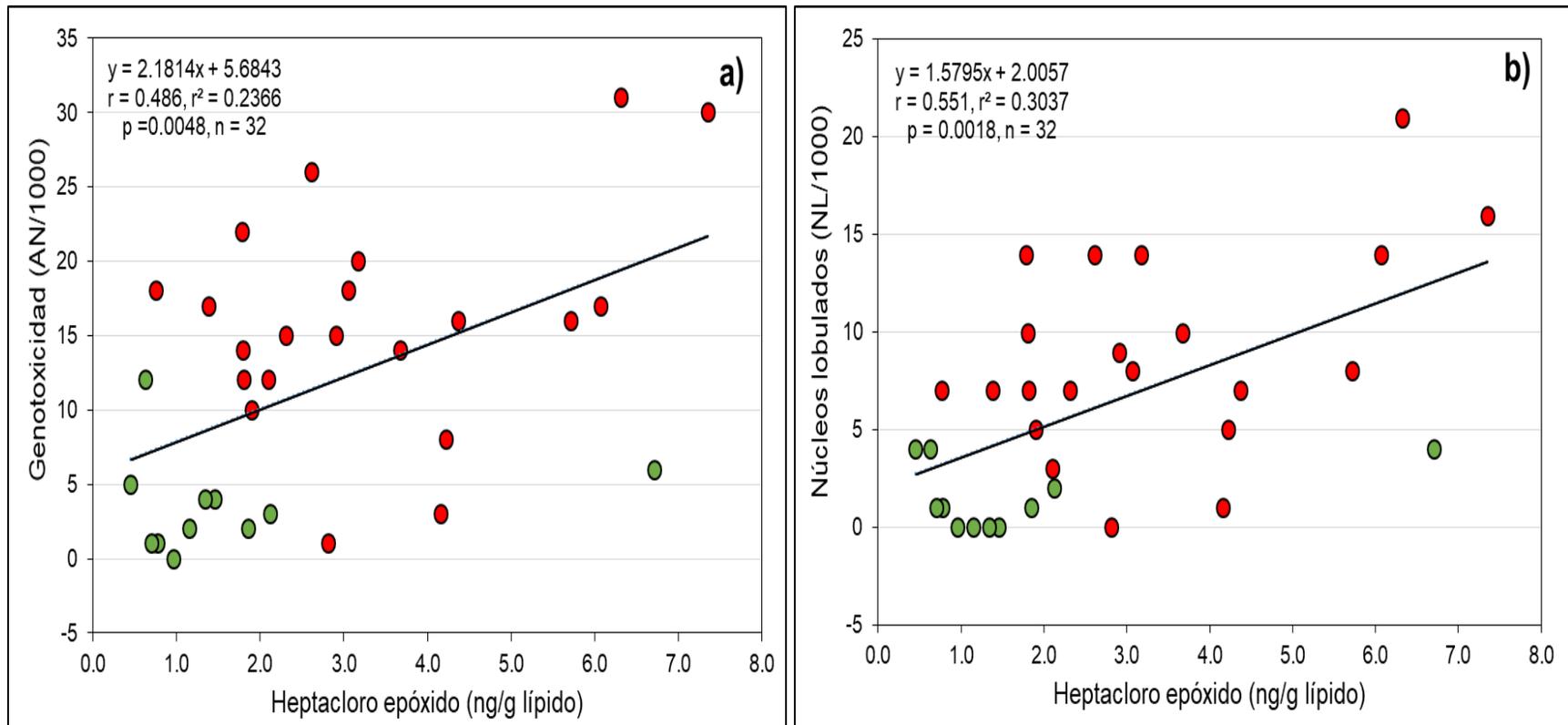
Compuesto	n	Valor de p					
		AP	NC	MN	NL	PC	GENO
α-HCH	43	0.094	0.245	0.826	0.558	0.159	0.595
β-HCH	22	0.822	0.440	0.641	0.993	0.346	0.765
Heptacloro	44	0.017	0.505	0.470	0.903	0.815	0.706
Heptacloro epóxido	32	0.873	0.904	0.116	0.001	0.444	0.005
Aldrin	15	0.239	0.474	0.559	0.752	0.977	0.670
4,4-DDE	38	0.952	0.716	0.456	0.201	0.550	0.234
2,4-DDD	42	0.961	0.017	0.291	0.042	0.358	0.064
2,4-DDT	45	0.884	0.035	0.326	0.034	0.341	0.059
4,4-DDT	45	0.832	0.046	0.414	0.057	0.260	0.086
Suma de BPC	5	0.607	0.850	0.651	0.647	0.766	0.983
Suma de COP	50	0.514	0.051	0.244	0.016	0.236	0.028

α-HCH (alfa-Hexaclorociclohexano), β-HCH (beta-Hexaclorociclohexano), 4,4-DDE (4,4,-Diclorodifenildicloroetileno), 2,4-DDD (2,4-Diclorodifenildicloroetano), 2,4-DDT (2,4- Diclorodifeniltricloroetano), 4,4-DDT (4,4- Diclorodifeniltricloroetano), suma de BPC (Suma de bifenilos policlorados), Suma COP (Suma de los COP), n=número de individuos, AP (células apoptóticas), NC (células necróticas), MN (micronúcleos), NL (Núcleos lobulados), PC (Puentes de cromatina), GENO (genotoxicidad).



AN (anormalidades nucleares) NL (núcleos lobulados). Puntos rojos= grupo expuesto, Puntos verdes= grupo de referencia.

Gráfica 12. Regresión lineal entre la suma de COP y las variables de genotoxicidad de ambas poblaciones de estudio.



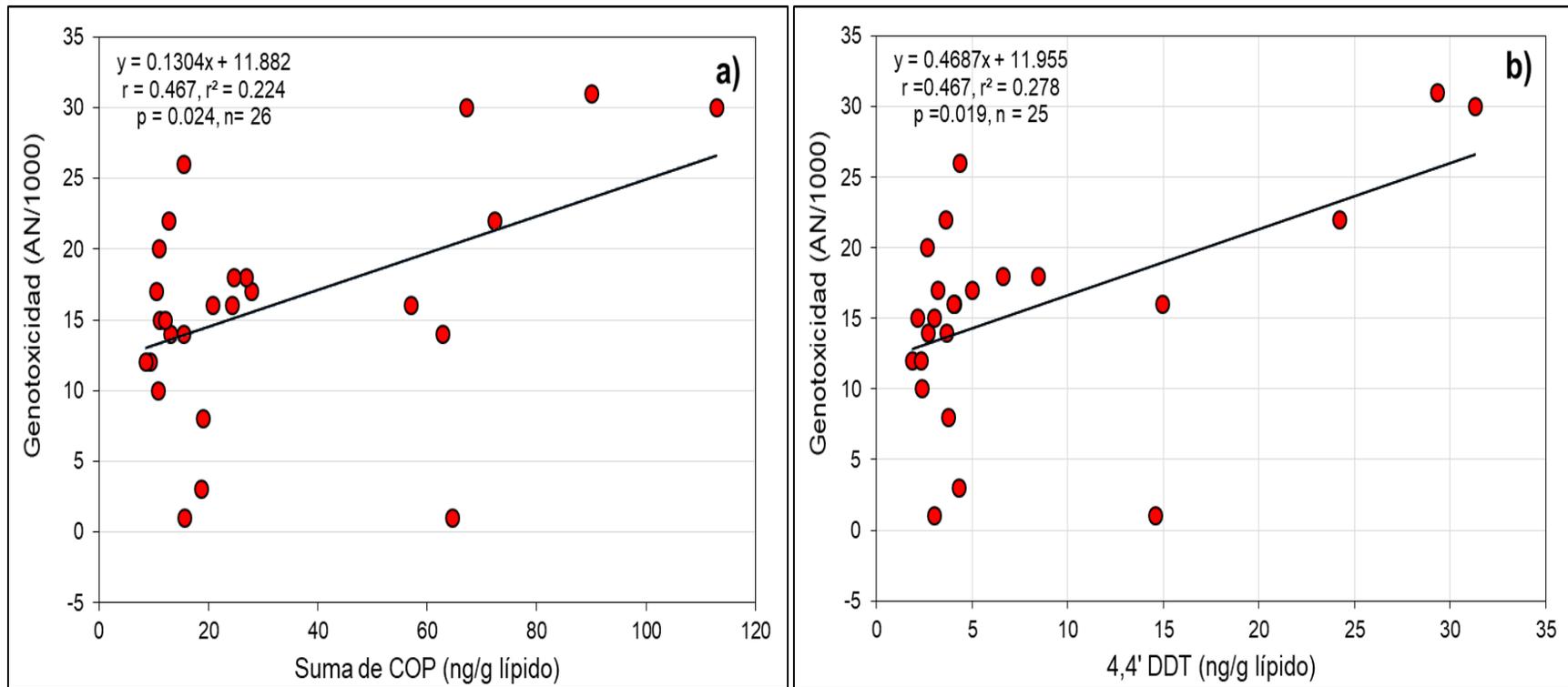
AN (anormalidades nucleares) NL (núcleos lobulados). Puntos rojos= grupo expuesto, Puntos verdes= grupo de referencia.

Gráfica 13. Regresión lineal entre el heptachloro epóxido y las variables de genotoxicidad de ambas poblaciones de estudio.

Tabla VII. Correlación de Person entre los COP y las variables de citotoxicidad y genotoxicidad del grupo expuesto

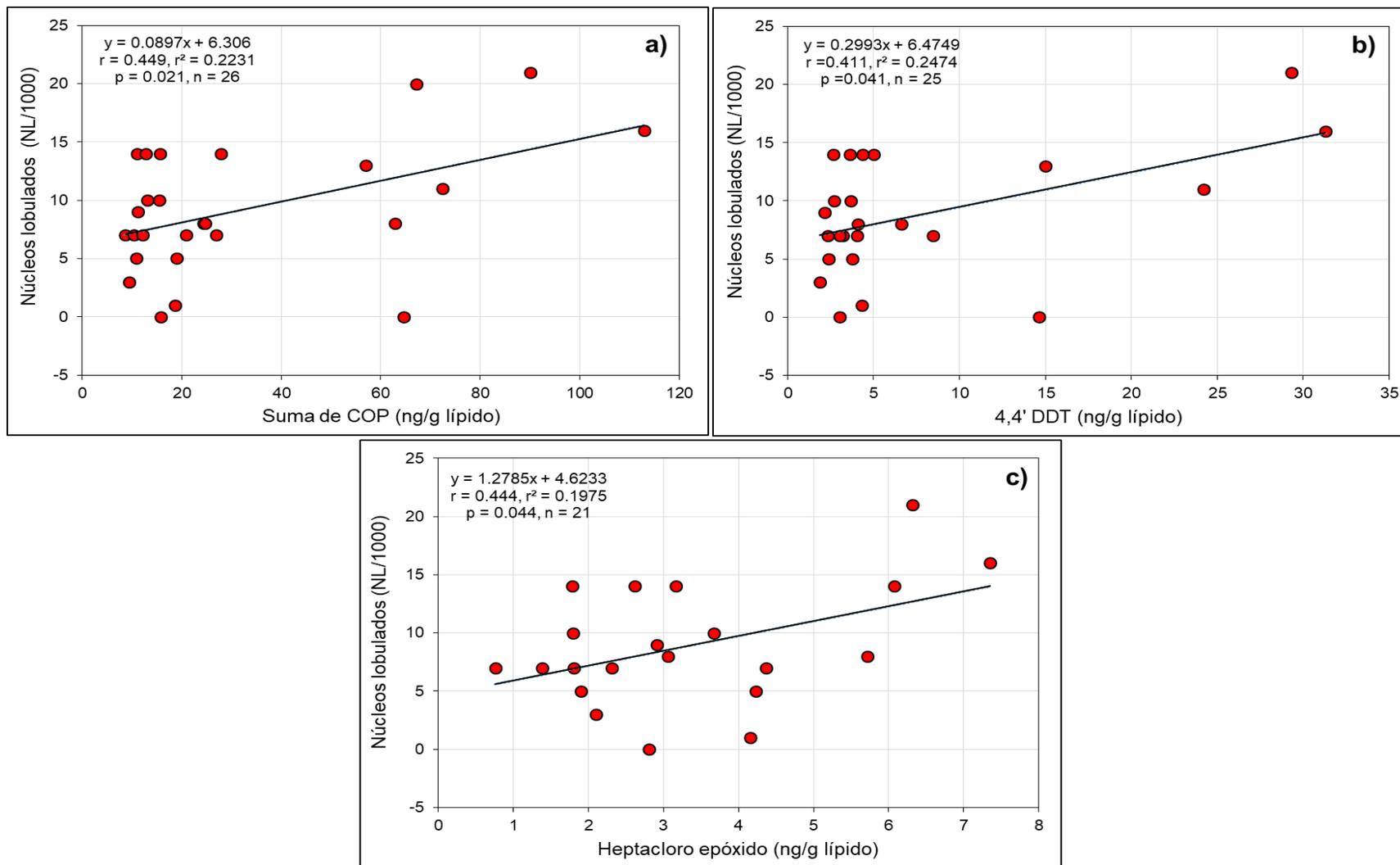
Compuesto	n	Valor de p					
		AP	NC	MN	NL	PC	GENO
α-HCH	22	0.212	0.049	0.721	0.077	0.372	0.117
β-HCH	7	0.395	0.862	0.454	0.497	0.218	0.391
Heptacloro	24	0.009	0.555	0.987	0.231	0.883	0.426
Heptacloro epóxido	21	0.073	0.572	0.907	0.044	0.574	0.126
Aldrin	12	0.256	0.290	0.109	0.275	0.928	0.155
4,4-DDE	20	0.484	0.906	0.756	0.470	0.691	0.493
2,4-DDD	24	0.668	0.015	0.516	0.128	0.468	0.133
2,4-DDT	26	0.667	0.016	0.740	0.153	0.492	0.210
4,4-DDT	25	0.359	0.177	0.202	0.041	0.079	0.019
Suma de COP	26	0.203	0.153	0.305	0.021	0.207	0.024

α-HCH (alfa-Hexaclorociclohexano), β-HCH (beta-Hexaclorociclohexano), 4,4-DDE (4,4, Diclorodifenildicloroetileno), 2,4-DDD (2,4-Diclorodifenildicloroetano), 2,4-DDT (2,4- Diclorodifeniltricloroetano), 4,4-DDT (4,4- Diclorodifeniltricloroetano), Suma COP (Suma de los COP), n= número de individuos, AP (células apoptóticas), NC (células necróticas), MN (micronúcleos), NL (Núcleos lobulados), PC (Puentes de cromatina), GENO (genotoxicidad).



AN (anormalidades nucleares), NL (núcleos lobulados).

Gráfica 14. Regresión lineal entre COP y genotoxicidad en el grupo expuesto.



NL (núcleos lobulados).

Gráfica 15. Regresión lineal entre COP y núcleos lobulados en el grupo expuesto.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados que describen a la población de estudio indicaron que ambos grupos son homogéneos en edad y parámetros antropométricos a pesar de que se presentó una diferencia significativa en el IMC en el grupo femenino de Texcalac con respecto al de referencia (22.8 ± 3.8 vs 21.0 ± 4.0 , grupo expuesto y de referencia, respectivamente).

Estudios previos han reportado que las zonas cercanas a complejos industriales del giro químico (Chovancová *et al.*, 2014), agroquímico (Zhao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), metal (Rada *et al.*, 2014), así como las zonas agrícolas (Zhou *et al.*, 2013), se encuentran mayormente impactadas por los COP. En este estudio, a pesar de que un porcentaje de la población del grupo de referencia vive cerca de zonas agrícolas no se vio reflejado en los niveles de estos compuestos en plasma. En contraste, en el grupo expuesto, los niveles de los COP en plasma podrían deberse en gran medida a la cercanía con dichas zonas.

Algunos estudios han reportado que el empleo de los utensilios de barro en la preparación de alimentos, representa una fuente de exposición a agentes genotóxicos (Santamaria-Gómez, 2010), si bien, la genotoxicidad en este estudio fue menor en el grupo de referencia, no debe pasarse por alto que el uso de estos utensilios puede ser un factor importante en el incremento de dicho efecto. Aunado a esto, el consumo de agua de grifo y el empleo de este líquido para preparar alimentos también representan riesgo y un factor considerable en el aumento de la genotoxicidad.

En cuanto al hábito de fumar, Londoño-Pérez *et al.* (2011), cita a la OMS (2003), quien clasifica a los fumadores en tres niveles: 1) Fumador leve: consume menos de 5 cigarrillos diarios; 2) Fumador moderado: consume un promedio de 6 a 15 cigarrillos diarios; y 3) Fumador severo: consume en promedio más de 16 cigarrillos por día. En este estudio un porcentaje de la población de ambos grupos presenta

este hábito (36.7% y 31.1%, Texcalac y Huiloapan, respectivamente), y todos los individuos que lo realizan se encuentran en el primer nivel (fumador leve). Sin embargo, algunos estudios han identificado el hábito de fumar como un factor sustancial que induce alteraciones en el material genético (Kopjar *et al.* 2006; Haveric *et al.*, 2010; Chandirasekar *et al.*, 2014). En cuanto al hábito de consumir alcohol Castillo-Cadena *et al.* (2006), consideran como criterio el consumo diario de alcohol y ningún individuo de este estudio lo realiza con esa frecuencia, por lo que no fueron considerados bebedores consuetudinarios.

Los efectos genotóxicos se pueden contrarrestar en cierta medida, con el consumo de antioxidantes los cuales, son capaces de retardar o prevenir las reacciones de oxidación que dan lugar a ERO (Obrenovich *et al.*, 2011). Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los COP generan ERO y ejercen un mecanismo de genotoxicidad mediante las vías de estrés oxidativo. En este estudio la población del grupo de referencia presenta un buen consumo de frutas y verduras, alimentos que proporcionan antioxidantes y pueden contribuir en la mitigación del daño al ADN.

Diversos estudios han evidenciado que los COP se relacionan con varios efectos en la salud. Por lo que, se ha recomendado emplear pruebas de rutina como la química sanguínea y recuentos sanguíneos con diferenciales, para evaluar los parámetros bioquímicos y hematológicos que permitan evidenciar efectos de inmunosupresión o dar indicio sobre el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes.

Algunos estudios han reportado asociaciones entre los niveles de los COP y el incremento de glucosa en sangre el cual representa un signo de diabetes (Langer *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2013). Entre los BPC detectados en este estudio se encuentra el congénere 74, que en estudios previos ha mostrado una fuerte relación con la diabetes (Lee *et al.*, 2007; Codru *et al.*, 2007), mientras que los congéneres 28 y 44 han sido asociados con el incremento del riesgo de enfermedad renal en

etapa terminal (Grice *et al.*, 2017), por otro lado, el β -HCH y el heptacloro epóxido han sido asociados positivamente con síndrome metabólico (Park *et al.*, 2010).

Los estudios experimentales en animales y ensayos *in vitro* con algunos COP muestran efectos inmunosupresores (Tryphonas, 1995; Mori *et al.*, 2008). Uno de los primeros estudios en reportar una asociación entre los COP y parámetros bioquímicos y hematológicos en población humana es el de Serdar *et al.* (2014), quienes evaluaron 19 compuestos similares a dioxinas (BPC, dioxinas y furanos), 17 BPC no similares a dioxinas y 5 plaguicidas organoclorados entre ellos p-p'-DDT y p-p'-DDE. Los resultados mostraron valores más bajos de leucocitos totales, globulos rojos, hemoglobina y hematocrito en el grupo con los niveles más altos de BPC en plasma. Para el caso del p-p'-DDT y p-p'-DDE no encontraron diferencias significativas.

Otro estudio realizado por Xu *et al.* (2015), reveló que los niveles séricos de monocitos y linfocitos fueron significativamente menores, mientras que los niveles de neutrófilos, hemoglobina, plaquetas y creatinina fueron significativamente más altos en el grupo expuesto. Además la sumatoria de BPC en el grupo de exposición fue significativamente mayor que en el grupo control (964.39 ng/g y 67.98 ng/g, respectivamente). Los resultados de linfocitos y monocitos de este estudio son similares. En cuanto a los valores de la suma de BPC, en el grupo expuesto no fueron detectados y en el grupo de referencia presentaron un intervalo de 0.02 a 0.60 ng/g lípido.

En conjunto, los resultados de la química sanguínea y de los parámetros hematológicos mostraron diferencias significativas en algunas de las variables analizadas, tanto para el género femenino como masculino. Sin embargo, la población de ambos grupos se encuentra clínicamente sana, puesto que, los valores obtenidos por género en cada grupo, se encuentran dentro de los valores de referencia establecidos por el laboratorio de análisis clínicos La Paz. Lo cual indica

que ninguno de los individuos evaluados presenta indicios de anemia, enfermedad renal, diabetes o inmunosupresión.

En cuanto al ensayo de micronúcleos con enfoque citoma, este permite evaluar diferentes eventos, entre ellos, el índice de división nuclear, donde los valores posibles tienen un rango de 1 a 2, en este estudio se obtuvo un valor promedio de 1.5 ± 0.2 y 1.2 ± 0.1 , grupo expuesto y de referencia, respectivamente, los cuales están dentro del intervalo, lo que indica una buena respuesta mitogénica de los linfocitos y que por lo tanto no hay un efecto citostático (Fenech, 2007), logrando una cantidad suficiente de células binucleadas para evaluar los marcadores de daño genotóxico.

En relación a los niveles de citotoxicidad, la apoptosis presentó diferencias significativas entre grupos (6.5 ± 2.5 FC/500 CT y 4.5 ± 0.8 FC/500 CT, Texcalac y Huiloapan, respectivamente), ambos valores son más altos que lo reportado en un estudio donde compararon individuos clínicamente sanos con individuos que presentaron sobrepeso y obesidad (1.21 ± 0.65 FC/1000 CT vs 1.25 ± 0.72 FC/1000 CT vs 2.38 ± 1.42 FC/1000 CT, respectivamente) (Donmez-Altuntas et al., 2014). La apoptosis es un proceso que requiere de una regulación génica específica, sin embargo, en células que presentan MN puede deberse en gran medida a la presencia de genes lamin-B activos, mismos que afectan los fenotipos celulares y por lo tanto, desencadenan dicho proceso (Utani et al., 2007). Además, la muerte celular inducida por el daño del genoma se ha encontrado en muchas otras enfermedades, como las neurodegenerativas, en estos casos la frecuencia aumenta, por el contrario, cuando la frecuencia se reduce, las células que deben eliminarse pueden persistir y reproducirse dando paso al desarrollo de tumores (Radi et al., 2014).

Al realizar la comparación de los individuos que presentan COP en plasma con aquellos que no, nuevamente se observó diferencia significativa, lo que indica que alguno de los compuestos presentes o la mezcla de ellos están ejerciendo un efecto

citotóxico sobre los linfocitos, tal como se ha reportado en estudios previos sobre la asociación de la exposición al DDT y a sus metabolitos con la apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (Alegría-Torres *et al.*, 2009).

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis es capaz de detectar eventos clastogénicos (ruptura de cromosomas) y aneugénicos (pérdida de cromosomas). Es una técnica validada por la OECD para aplicarse *in vivo* en mamíferos con el propósito de identificar sustancias que causan daño citogénico (OECD, 2016). El empleo de este ensayo para la evaluación de la genotoxicidad en población humana muestra simplicidad de la puntuación, es ampliamente aplicable en diferentes tipos de células, es predictivo para cáncer y esta validada a nivel internacional, mediante el desarrollo del proyecto “HUMN” (International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human), el cual permitió uniformizar criterios en el número de MN a nivel internacional mediante el establecimiento de las frecuencias basales de MN en linfocitos de sangre periférica de poblaciones analizadas en varios laboratorios del mundo, registrando valores promedio entre 4.48 y 5.70 MN/1000 (Fenech *et al.*, 2003).

Dichos valores permiten hacer comparaciones entre poblaciones expuestas y no expuestas a agentes genotóxicos. En este estudio el resultado de la frecuencia de MN fue significativamente mayor en el grupo expuesto respecto al control (5.0 ± 2.5 vs 2.0 ± 0.5 MN/1000 respectivamente), y también en relación al valor basal registrado a nivel internacional. En el estudio de Donmez-Altuntas *et al.* (2014), el valor de MN en el grupo de individuos clínicamente sanos fue de 1.21 ± 0.65 MN/1000, el cual es más bajo que en los grupos expuesto y de referencia. Por otro lado, el ensayo de MN fue empleado como predictor de cáncer de pulmón en dos grupos de fumadores ($n=527$ y $n=239$) y sus respectivos controles ($n=468$ y $n=272$), donde se reportaron valores de 3.54 ± 0.99 MN/1000 y 3.60 ± 1.01 MN/1000 para los fumadores, mismos que están por debajo de lo observado en el grupo de Texcalac. En cuanto a los valores que se reportaron para los grupos control ($1.76 \pm$

0.83MN/1000 y 1.81 ± 0.87 MN/1000), son similares a los observados en el grupo de Huiloapan.

La acumulación de cambios genéticos puede conducir a la inestabilidad genética y como consecuencia al desarrollo de cancer, por ello, la frecuencia de anomalías nucleares, principalmente micronúcleos, se ha convertido en un buen biomarcador de riesgo temprano a cáncer, tal como se ha evidenciado en diversos estudios. Uno de ellos es el reportado por Bonassi *et al.* (2007), quienes realizaron un estudio prospectivo en el marco del proyecto HUMN, dando seguimiento a la incidencia de varios tipos de cancer en un total de 6 718 individuos de 10 países seleccionados de 20 laboratorios entre 1980 y 2002. Encontraron un aumento significativo de riesgo de cancer en aquellos individuos que presentaban frecuencias de MN en el tercil medio o alto en comparación con aquellos en el tercil de baja frecuencia.

En relación a los NL, el grupo expuesto presentó un valor de 8.0 ± 4.3 NL/1000, el cual es mayor en comparación con un grupo de agricultores expuestos a plaguicidas (1.22 ± 0.21 NL/1000) (Coskun *et al.*, 2011), así como, con la frecuencia basal reportada por Gajski *et al.* (2013), en una población infantil (1.44 ± 0.19 NL/1000), empero, estos resultados son similares al valor observado en el grupo de Huiloapan (2.0 ± 0.5 NL/1000). Por otro lado, el valor del grupo expuesto es similar con lo reportado por Lee *et al.* (2014a), en dos grupos de adultos mayores, uno con deterioro cognitivo leve (8.47 ± 0.83 NL/1000) y el otro con Alzheimer (6.80 ± 0.96 NL/1000), de la misma manera, con lo reportado por Sinitsky *et al.* (2016), en un grupo de mineros del carbón (7.23 ± 2.54 NL/1000).

Respecto a los PC, los valores observados en este estudio (1.0 ± 1.3 PC/1000), son similares con los presentados en el grupo de agricultores expuestos a plaguicidas (0.50 ± 0.22 PC/1000) (Coskun *et al.*, 2011), con los datos reportados por El-Zein *et al.* (2014), en los grupos control (0.99 ± 0.62 PC/1000 y 1.02 ± 0.66 PC/1000), así como, con lo reportado por Zhan *et al.* (2015), en un grupo de trabajadores expuestos a materia particulada de motores diésel.

Las anormalidades nucleares evaluadas mediante el ensayo de MN con enfoque citoma especialmente NL y PC, aun no tienen un significado biológico completamente esclarecido, sin embargo, se ha recavado evidencia suficiente indicando que bajo condiciones patológicas (obesidad, diferentes tipos de cáncer, problemas hematológicos como: linfoma inmunoblástico, Hodgkin; leucemia aguda megaloblástica, entre otras), o de exposición (sustancias psicoactivas, xenobióticos), se observan altas frecuencias de células con anormalidades nucleares (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

En cuanto al nivel de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo cometa se obtuvo un DICA promedio de 126.5 ua este valor es más alto en relación a lo mencionado por dos estudios que evalúan a trabajadores expuestos a plaguicidas, por una parte Benedetti *et al.* (2013), reportan un promedio de 38.5 ua en trabajadores de la soja, mientras que Wilhelm *et al.* (2014), reportan en floricultores un promedio de 4.73 ua. Respecto a niveles basales, Pupo-Balboa *et al.* (2014), reporta un promedio de 34.98 ua en una población de la Habana, por otro lado, Acosta-Tlapalamatl (2016), reporta promedio basal de 64.2 ua en una población juvenil de Tlaxcala.

En todos los casos la genotoxicidad es un factor de gran impacto para la salud, ya que entre sus consecuencias se encuentran los defectos al nacimiento, las alteraciones metabólicas, los cambios en la fertilidad y las enfermedades crónico-degenerativas (Bagci *et al.*, 2006).

Es complicado determinar el potencial de promoción de tumores de los COP debido a que dichos compuestos generalmente no se encuentran como compuestos independientes, sino que, están presentes como mezclas químicas debido a su comportamiento ambiental, las redes tróficas y la retención a largo plazo en el tejido adiposo, por lo que las interacciones tanto antagónicas como sinérgicas en ciertas combinaciones implica el aumento del riesgo de todo tipo de cáncer. Sin embargo, es muy probable que una sustancia sea carcinogénica en humanos si esta sustancia

es también carcinogénica en animales con los que se comparten una gran cantidad de genes (Carpenter, 2006).

En los estudios realizados en poblaciones donde solo se evalúa la exposición de fondo a los COP, los resultados sobre los efectos de un compuesto específico no pueden ser interpretados como debidos únicamente a ese compuesto; más bien, es probable que reflejen las propiedades de la mezcla de los COP de la cual el compuesto es parte (Lee *et al.*, 2014b).

IX. CONCLUSIÓN

En conclusión, de acuerdo al uso y aplicaciones que se les han dado a los COP y a las características que poseen, prácticamente en la sociedad moderna no existe un grupo de población sin exposición a estos compuestos, como se pudo observar en este trabajo al detectar estos compuestos en ambas zonas de estudio.

Los resultados indican que la población de Texcalac ha estado expuesta a los COP y los niveles en plasma se encuentran dentro del intervalo observado por otros autores, por lo que se vislumbra una exposición a concentraciones bajas. Por otro lado, todos los niveles de los análisis clínicos estuvieron dentro de los rangos normales, sin embargo, los biomarcadores de efecto presentaron valores altos, lo que podría dar paso al desarrollo de alteraciones clínicas evidentes a corto o largo plazo en la población.

Es importante mencionar que el presente trabajo representa la primera evaluación reportada para este grupo de población en el estado de Tlaxcala, por lo que es relevante para la generación de antecedentes en el área de salud pública. Sin embargo, será necesario realizar estudios futuros de biomonitorio que permitan analizar otros efectos posibles relacionados a la exposición crónica de los COP, así como, el desarrollo de estrategias para la reducción de exposición a estos compuestos.

X. LITERATURA CITADA

- Acosta-Tlapalamatl, M. 2016. Evaluación genotóxica en una población juvenil de Tlaxcala. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Aguayo, J., Arena, J., Díaz-Gómez, M., Gómez, A., Hernández-Aguilar, M., Landa, I., et al. 2004. Lactancia materna: Guía para profesionales. Madrid: Ergon.
- Albert, L. 1995. Contaminación ambiental. Origen, clases, Fuentes y efectos. En Flores, J., López-Moreno, S. Albert, L. (Eds.)(pp.37-52). México: Centro de Ecología y Desarrollo.
- Alegría-Torres, J. A., Díaz-Barriga, F., Gandolfi, A. J., and Pérez-Maldonado, I. N. 2009. Mechanisms of p, p'-DDE-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology In Vitro*, 23(6): 1000-1006.
- Almaguer, G. C. 2003. Interpretación clínica de la biometría hemática. *Medicina Universitaria*, 5(18): 35.
- Alvarez-Pedrerol, M., Guxens, M., Ibarluzea, J., Rebagliato, M., Rodríguez, A., Espada, M., et al. 2009. Organochlorine compounds, iodine intake, and thyroid hormone levels during pregnancy. *Environ Sci Technol* 43(20):7909–7915.
- Amaro, A.R., Oakley, G.G., Bauer, U., Spielmann, H.P. and Robertson, L.W. 1996. Metabolic activation of PCBs to quinones: reactivity toward nitrogen and sulfur nucleophiles and influence of superoxide dismutase. *Chem Res Toxicol*, 9(3):623–9.
- Andersson, P. 2003. Functional role of constitutively active dioxin/Ah receptor in a transgenic mouse model. Estocolmo; Karolinska University Press.
- Arango, V. y Sandra, S. 2012. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1):75-82.
- Arencibia, D. F. y Rosario, L. A. 2009. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Revista de toxicología en línea* 20:18.
- Arrebola, J. P., Belhassen, H., Artacho-Cordón, F., Ghali, R., Ghorbel, H., Boussen, H., et al. 2015. Risk of female breast cancer and serum concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: A case–control study in Tunisia. *Science of the Total Environment*, 520:106-113.
- Ashraf, M. A. 2017. Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge. *Environ Sci Pollut Res*, 24:4223–4227

- Ashraf, M.A., Sarfraz, M. and Naureen, R. 2015. Environmental impacts of metallic elements: speciation. Bioavailability and Remediation, Springer, Singapore
- Asp, V., Ulleras, E., Lindstrom, V., Bergstrom, U., Oskarsson, A., and Brandt, I. 2010. Biphasic hormonal responses to the adrenocorticolytic DDT metabolite 3-methylsulfonyl-DDE in human cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 242(3): 281-289.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1995. Toxicological profile for mirex and chlordecone. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GE, EE.UU
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2001. Toxicological profile for pentachlorophenol. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GE, EE.UU
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2002. Toxicological profile for hexachlorobenzene. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GE, EE.UU
- Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K., et al. 2005. Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in a female reproduction. *Molecular and cellular biology*, 25(22): 10040–10051.
- Bagci, E. Z., Vodovotz, Y., Billiar, T. R., Ermentrout, G. B., and Bahar, I. 2006. Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. *Biophysical journal*, 90(5): 1546-1559.
- Baibergenova, A., Kudryakov, R., Zdeb, M., and Carpenter, D.O. 2003. Low birth weight and residential proximity to PCB contaminated waste sites. *Environ. Health Perspect.* 111: 1352–1357.
- Bajpayee, M., Kumar, A., and Dhawan, A. 2013. The comet assay: assessment of in vitro and in vivo DNA damage. In Dhawan, A. and Bajpayee, M. (eds). *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols*, Methods in molecular biology, 1044:325-345.
- Balachandar, V., Arun, M., Devi, S. M., Velmurugan, P., Manikantan, P., Kumar, A. K., et al. 2010. Evaluation of the genetic alterations in direct and indirect exposures of hexavalent chromium [Cr (VI)] in leather tanning industry workers North Arcot District, South India. *International archives of occupational and environmental health*, 83(7): 791-801.

- Barker, A., Sharp, S. J., Timpson, N. J., Bouatia-Naji, N., Warrington, N. M., Kanoni, S., et al. 2011. Association of genetic loci with glucose levels in childhood and adolescence. *Diabetes*, 60(6): 1805-1812.
- Beischlag, T. V., Luis Morales, J., Hollingshead, B. D. and Perdew, G. H. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*, 18: 207–250.
- Belles-Isles, M., Ayotte, P., Dewailly, E., Weber, J.P. and Roy, R. 2002. Cord blood lymphocyte functions in newborns from a remote maritime population exposed to organochlorines and methylmercury. *Toxicol Environ Health A*, 65(2):165-182.
- Bender, R.P., Lehmler, H.J., Robertson, L.W., Ludewig, G. and Osheroff, N. 2006. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites poison human topoisomerase II α : altering enzyme function by blocking the N-terminal protein gate. *Biochemistry*, 45(33):10140–52.
- Benedetti, D., Nunes, E., Sarmiento, M., Porto, C., dos Santos, C. E. I., Dias, J. F., et al. 2013. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 752(1):28-33.
- Berg, V., Nost, T. H., Pettersen, R. D., Hansen, S., Veyhe, A. S., Jorde, R., et al. 2017. Persistent organic pollutants and the association with maternal and infant thyroid homeostasis: a multipollutant assessment. *Environmental health perspectives*, 125(1): 127.
- Bergonzi, R., De Palma, G., Tomasi, C., Ricossa, M.C. and Apostoli, P. 2009. Evaluation of different methods to determine total serum lipids for normalization of circulating organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 82:1241-1247.
- Bilbao, I. C., Roblero, M. S., and García-Fernández, N. 2009. Estudios de función renal: función glomerular y tubular. *Análisis de la orina. Nefroplus*, 2(1): 17-30.
- Boada, L.D., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Almeida-González, M., Alvarez-León, E.E., Serra-Majem, L., et al. 2012. Complex organochlorine pesticide mixtures as determinant factor for breast cancer risk: a population-based case-control study in the Canary Islands (Spain). *Environ Health*, 11:28.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., and Main, K. M. 2012. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and cellular endocrinology*, 355(2): 240-248.

- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., et al. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3):625-631.
- Bonfeld-Jorgensen, E. C., Andersen, H. R., Rasmussen, T. H., and Vinggaard, A. M. 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology*, 158(3): 141-153.
- Bonfeld-Jorgensen, E.C., Ghisari, M., Wielsoe, M., Bjerregaard-Olesen, C., Kjeldsen, L.S. and Long, M. 2014. Biomonitoring and hormone-disrupting effect biomarkers of persistent organic pollutants in vitro and ex vivo. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 115:118–128.
- Bonfeld-Jorgensen, E.C., Long, M., Bossi, R., Ayotte, P., Asmund, G., Kruger, T., et al. 2011. Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study. *Environmental Health*, 10(1):88.
- Botella, B., Crespo, J., Rivas, A., Cerrillo, I., Olea-Serrano, M.F., Olea, N., 2004. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environmental Research*, 96(1): 34-40.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M. and Jones, K.C. 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners a mass balance approach 1. Global production and consumption. *Science Total Environment*, 290:181–198.
- Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E. et al. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind Health* 14(1-2):59–84
- Brown, L. M., Burmeister, L. F., Everett, G. D., and Blair, A. 1993. Pesticide exposures and multiple myeloma in Iowa men. *Cancer Causes and Control*, 4(2): 153-156.
- Brustad, M., Sandanger, T.M., Andersen, V., Lund, E. 2007. POP exposure from fish liver consumption and risk of cancer—the Norwegian women and cancer study. *Environ. Monit.* 9 (7): 682–686.
- Buccini, J. 2003. The development of a global treaty on persistent organic pollutants (POPs). In: Fiedler, H. (ed). *The hand book of environmental chemistry, per persistent organic pollutants*, 3rd edn. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Busse, W.W., Lemanske, Jr R.F. and Gern, .JE. 2010. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*, 376:826–34.

- Cabaravdic, M. 2006. Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer. *Medical Archives*, 60:97–100.
- Cantu-Soto, E.U., Meza-Montenegro, M.M., Valenzuela-Quintanar, A.I., Félix-Fuentes A., Grajeda-Cota, P., Balderas-Cortes, et al. 2011. Residues of organochlorine pesticides in soils from the southern Sonora, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 87(5):556-560.
- Carbajal-López, Y., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M. E., and Martínez-Arroyo, A. 2016. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3):2513-2520.
- Carozza, S.E., Li, B., Elgethun, K. and Whitworth, R. 2008. Risk of childhood cancers associated with residence in agriculturally intense areas in the United States. *Environ Health Perspect*, 116:559–65.
- Carpenter, D. O. 2006. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Reviews on environmental health*, 21(1), 1-24.
- Casals-Casas C, Desvergne B. 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol*, 73:135-62.
- Casas, M., Nieuwenhuijsen, M., Martínez, D., Ballester, F., Basagaña, X., Basterrechea, M., et al. 2015. Prenatal exposure to PCB-153, p, p'-DDE and birth outcomes in 9000 mother-child pairs: Exposure-response relationship and effect modifiers. *Environment international*, 74: 23-31.
- Castillo-Cadena, J., Tenorio-Vieyra, L. E., Quintana-Carabia, A. I., Garcia-Fabila, M. M., Juan, E. and Madrigal-Bujaidar, E. 2006. Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. *BioMed Research International*, 2006:1-12.
- Castillo-Castañeda, P.C., Gaxiola-Robles, R., Méndez-Rodríguez L.C., Labrada-Martagón, V. and Zenteno-Savín, T. 2016. Antioxidants, reactive oxygen species and oxidative damage associated to the presence of organochlorine pesticides in breast milk. *Nutr Hosp.*, 33(2):422-430
- CCA (Comisión para la Cooperación Ambiental). 2014. Documento marco: caracterización de la vulnerabilidad a la contaminación en América del Norte. Comisión para la Cooperación Ambiental. Montreal, Canadá, 58 p.
- Chandirasekar, R., Kumar, B. L., Sasikala, K., Jayakumar, R., Suresh, K., Venkatesan, et al. 2014. Assessment of genotoxic and molecular mechanisms of cancer risk in

- smoking and smokeless tobacco users. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 767:21-27.
- Chovancová, J., Drobná, B., Fabišiková, A., Čonka, K., Wimmerová, S., and Pavuk, M. 2014. Polychlorinated biphenyls and selected organochlorine pesticides in serum of Slovak population from industrial and non-industrial areas. *Environmental monitoring and assessment*, 186(11):7643-7653.
- Codru, N., Schymura, M. J., Negoita, S., Rej, R., Carpenter, D. O., and Akwesasne Task Force on the Environment. 2007. Diabetes in relation to serum levels of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in adult Native Americans. *Environmental health perspectives*, 115(10):1442-1447.
- Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molec Biotech*, 26:249-261.
- Collins A.R., Oscoz, A.A., and Brunborg, G. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3):143–151
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Moller, P., et al. 2013. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 759, 27-39.
- Cortinas, De N., C. 2001. Diagnóstico Nacional de Bifenilos Policlorados en México. Reporte Final. Acosta y Asociados. Proyecto INE-1/01. Diciembre del 2001/Abril 2003. Preparado para: Instituto Nacional de Ecología No. INE/AD-084.
- Coskun, M., Coskun, M., Cayir, A., and Ozdemir, O. 2011. Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey. *Environment international*, 37(1):93-96.
- Costner, P. 2006. Estimando las liberaciones y priorizando las fuentes de dioxinas en el Convenio de Estocolmo. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM).
- Crinnion, W. J. 2011. Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Alternative Medicine Review*, 16(1):5-13.
- Cruz, A. C., Moreno, G. F., y Lara, M. O. 2010. Toxicología de las dioxinas y su impacto en la salud humana. *Revista Medicina Veterinaria*, (19): 73-84.
- Dai Y, Zhu H, Wang W, Meng W, Yu Y, Li F, et al. 2009. Feasibility of foliage as bio-monitors for organochlorine pesticides in air Chinese. *Sci Bull*, 54(9):1515-1521.

- Darnerud, P.O., Morse, D., Klasson-Wehler, E. and Brouwer, A. 1996. Binding of a 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) metabolite to fetal transthyretin and effects on fetal thyroid hormone levels in mice. *Toxicology*. 106(1-3):105–114.
- Darras, V.M. 2008. Endocrine disrupting polyhalogenated organic pollutants interfere with thyroid hormone signalling in the developing brain. *Cerebellum* 7: 26–37.
- De Tata, V. 2014. Association of dioxin and other persistent organic pollutants (POPs) with diabetes: Epidemiological evidence and new mechanisms of beta cell dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* 15(5):7787– 7811.
- Dhananjayan, V., Ravichandran, B., and Rajmohan, H.R. 2012. Organochlorine pesticide residues in blood samples of agriculture and sheep wool workers in Bangalore (rural), India. *Bull Environ Contam Toxicol*, 88(4):497–500.
- Dhawan A., Bajpayee M. and Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*. 25: 5-32.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S. and Soto, A. M. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4):293-342.
- Diani-Moore, S., Ram, P., Li, X., Mondal, P., Youn, D. Y., Sauve, A. A., et al. 2010. Identification of the aryl hydrocarbon receptor target gene TlPARP as a mediator of suppression of hepatic gluconeogenesis by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and of nicotinamide as a corrective agent for this effect. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50):38801-38810.
- Díaz-Barriga F. 1999. Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados. OPS/CEPIS. Agencia Alemana de Cooperación Técnica 42p.
- Díaz-Barriga, F., Borja-Aburto, V., Waliszewski, S.M. y Yáñez, L. 2003. DDT in Mexico. In *Persistent Organic Pollutants, The Handbook of Environmental Chemistry*; Fiedler, H., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 3: 371–388.
- Donmez-Altuntas, H., Sahin, F., Bayram, F., Bitgen, N., Mert, M., Guclu, K., et al. 2014. Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 771:30-36.
- Dusinska, M., Staruchova, M., Horska, A., Smolkova, B., Collins, A., Bonassi, S., et al. 2012. Are glutathione S transferases involved in DNA damage signalling? Interactions with DNA damage and repair revealed from molecular epidemiology studies. *Mutation*

- Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 736(1):130-137.
- Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A., and Collins, A. R. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56(6):1291-1295.
- El-Shahawi, M. S., Hamza, A., Bashammakh, A. S., and Al-Saggaf, W. T. 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*, 80(5):1587-1597.
- El-Zein, R. A., Lopez, M. S., D'Amelio, A. M., Liu, M., Munden, R. F., Christiani, D., et al. 2014. The cytokinesis-blocked micronucleus assay as a strong predictor of lung cancer: extension of a lung cancer risk prediction model. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 23(11):2462-2470.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Office of Research and Development. EPA/630/R-96/012,1997TCDD
- EPA (Environmental Protection Agency). 2000. Exposure and human Health Reassessment of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. Part 1: estimating exposure to dioxin-like compounds, vol 2: sources of dioxin-like compounds in the United States. EPA/600/P-00/001Bb
- EPA (Environmental Protection Agency). 2011. Pesticides Industry Sales and Usage. 2006 and 2007 Market Estimates. Biological and Economic Analysis Division, Office of Pesticide Programs, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1): 81-95.
- Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1): 58-66.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5):1084-1104.
- Fenech, M., and Crott, J. W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1):131-136.

- Fenech, M., and Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., et al. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1):65-75.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., and Bonassi, S. 1999. The HUMAN MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1), 271-283.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5): 359–386.
- Fischbach, F.T. 1997. *Manual de Pruebas Diagnosticas*. 5ª Edición. McGraw Hill Interamericana.
- Frigo, D. E., Tang, Y., Beckman, B. S., Scandurro, A. B., Alam, J., Burow, M. E., et al. 2004. Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis*, 25(2): 249-261.
- Fujii-Kuriyama, Y., and Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1): 311-317.
- Gajski, G., Gerić, M., Oreščanin, V., and Garaj-Vrhovac, V. 2013. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 750(1):55-62.
- García, C.A., Rosado, P.D. y Salas, L.M.S. 2016. Panorama actual de los contaminantes orgánicos persistentes. *Biociencias*, 7(1).
- Garner, C.E. and Matthews, H.B. 1998. The effect of chlorine substitution on the dermal absorption of polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol*, 149:150-158.
- Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., and Vrijheid, M. 2013. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. *Environment international*, 52, 51-65.

- Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.*, 5:497–526.
- Gentile, N., Mañas, F., Bosch, B., Peralta, L., Gorla, N., and Aiassa, D. 2012. Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(6):816-822.
- Gerić, M., Ceraj-Cerić, N., Gajski, G., Vasilić, Ž., Capuder, Ž. and Garaj-Vrhovac, V. 2012. Cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to low concentrations of p, p'-DDT, and its metabolites (p, p'-DDE, and p, p'-DDD) in vitro. *Chemosphere*, 87(11):1288-1294.
- Gierthy, J.F., Arcaro, K.F. and Floyd, M., 1997. Assessment of PCB estrogenicity in a human breast cancer cell line. *Chemosphere* 34:1495–1505.
- Giesy, J. P., and Kannan, K. 1998. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Critical reviews in toxicology*, 28(6):511-569.
- Giovannelli, L., Pitozzi, V., Riolo, S., and Dolara, P. 2003. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1):71-80.
- Glynn, A., Thuvander, A., Aune, M., Johannisson, A., Darnerud, P. O., Ronquist, G., et al. 2008. Immune cell counts and risks of respiratory infections among infants exposed pre-and postnatally to organochlorine compounds: a prospective study. *Environmental Health*, 7(1):62.
- Goldner, W.S, Sandler, D.P, Yu, F., Hoppin, J.A., Kamel, F., and Levan, T.D. 2010. Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol* 171: 455–464.
- Gouin, T., Mackay, D., Jones, K.C., Harner, T. and Meijer, S.N. 2004. Evidence for the “grasshopper” effect and fractionation during long-range atmospheric transport of organic contaminants. *Environ Pollut*, 128: 139–148
- Grice, B. A., Nelson, R. G., Williams, D. E., Knowler, W. C., Mason, C., Hanson, et al. 2017. Associations between persistent organic pollutants, type 2 diabetes, diabetic nephropathy and mortality. *Occup Environ Med*, 74:521-527.

- Guo, Y.L., Lambert, G.H., Hsu, C.C. and Hsu, M.M. 2004. Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int Arch Occup Environ Health*, 77:153-158.
- Hahn, M. E. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: Diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 141:131–160.
- Hallgren, S., Sinjari, T., Hakansson, H. and Darnerud, P.O. 2001. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Environ Contam Toxicol*, 75:200–208
- Haryanto, B. 2012. *Air Pollution: A Comprehensive Perspective*. InTech
- Haveric, A., Haveric, S., and Ibrulj, S. 2010. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(5):260-266.
- Hectors, T.L.M., Vanparys, C., Van der Ven, K., Martens, G.A., Jorens, P.G., Van Gaal, L.F., et al. 2011. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia*, 54(6):1273–1290.
- Heilmann, C., Grandjean, P., Weihe, P., Nielsen, F. and Budtz-Jorgensen, E. 2006. Reduced antibody responses to vaccinations in children exposed to polychlorinated biphenyls. *PLoS medicine*, 3(8):e311.
- Hellou, J., Lebeuf, M., and Rudi, M. 2012. Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. *Environmental Reviews*, 21(1):53-69.
- Herkovits, J. (2000). Efectos adversos de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en el período perinatal: compuestos tipo dioxinas. *Arch. argent. pediatr*, 98(3):182.
- Herrera-Portugal, C., Ochoa-Díaz López, H., Franco-Sánchez, G., and Díaz-Barriga, F. 2005. DNA damage in children exposed to DDT in a malarious area of Chiapas, Mexico. *Acta Toxicologica Argentina*, 13(1):12-16.
- Hertz-Picciotto, I., Park, H. Y., Dostal, M., Kocan, A., Trnovec, T., and Sram, R. 2008. Prenatal exposures to persistent and non-persistent organic compounds and effects on immune system development. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102:146–154.
- Howdeshell, K.L. 2002. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect* 110(3):337–348.
- Howell, G., 3rd. and Mangum L. 2011. Exposure to bioaccumulative organochlorine compounds alters adipogenesis, fatty acid uptake, and adipokine production in NIH3T3–L1 cells. *Toxicol In Vitro*, 25(1):394–402.

- Huang, X., Lessner, L., and Carpenter, D. O. 2006. Exposure to persistent organic pollutants and hypertensive disease. *Environmental research*, 102(1):101-106.
- Humphrey, H. E., Gardiner, J. C., Pandya, J. R., Sweeney, A. M., Gasior, D. M., McCaffrey, R. J., et al. 2000. PCB congener profile in the serum of humans consuming Great Lakes fish. *Environmental health perspectives*, 108(2):167.
- Hurtado, M.R., Mellado, O., Y., Flores, R.G. and Vargas, V. P. 2010. Semiología de la citometría hemática. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(004).
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2016. Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 107, Lyon, France: IARC Press; 2016:502.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2017. Catálogo Único de Claves de Áreas Geoestadísticas Estatales, Municipales y Localidades. Obtenida el 5 de marzo de 2017 de <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/CatalogoClaves.aspx>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2017. Catálogo Único de Claves de Áreas Geoestadísticas Estatales, Municipales y Localidades. Obtenida el 15 de diciembre de 2017, de <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/CatalogoClaves.aspx>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1995. Panotla. Estado de Tlaxcala. Cuaderno estadístico municipal. Mexico. 116 p.
- INEGI. (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2012. Programa agropecuario en Tlaxcala. Censo agropecuario 2007.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). 2003. Polychlorinated biphenyls: Human health aspects. Concise international chemical assessment document. No 55. 58 p. Geneva: World Health Organization.
- Jeong, Y., Lee, S., Kim, S., Park, J., Kim, H. J., Choi, G., et al. 2017. Placental transfer of persistent organic pollutants and feasibility using the placenta as a non-invasive biomonitoring matrix. *The Science of the total environment*, 612:1498.
- Johansson, M., Nilsson, S. and Lund, B.O. 1998. Interactions between methylsulfonyl PCBs and the glucocorticoid receptor. *Environ. Health Perspect*, 106 (12):769– 772.
- Juárez-Santacruz, L., García-Nieto, E., Costilla-Salazar, R., García-Gallegos, E., Coronel-Olivares, C., Gómez-Camarillo, A.M. y Gaytán-Oyarzín, J.C. 2013. Assessment of the genotoxic potencial of sediments contaminated with POP's and agricultural soils

- Vicia faba micronucleus assay. *Soil and Sediment Contamination an International Journal*, 22 (1):288-300.
- Juárez-Santacruz, L., García-Nieto, E., García-Gallegos, E., Romo-Gómez, C., Ortiz-Ortiz, E., Costilla-Salazar, R., et al. 2015. DNA damage in *Vicia faba* by exposure to agricultural soils from Tlaxcala, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 95(6):764-769.
- Kadioglu, E., Sardas, S., Aslan, S., Isik, E. and Karakaya, A. E. 2004. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*, 9(2): 203-209.
- Karami-Mohajeri, S. and Abdollahi, M. 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and experimental toxicology*, 30(9):1119–1140.
- Karlson, K., Ishaq, R., Becker, G., Berggren, P., Broman, D. and Colmosjo, A. 2000. PCBs, DDTs and methyl sulfone metabolites in various tissues of harbour porpoises from Swedish waters. *Environ Pollut*, 110:29-46
- Kato, Y., Haraguchi, K., Shibahara, T., Yumoto, S., Masuda, Y. and Kimura, R. 2000. Reduction of serum thyroxine concentrations by methylsulfonyl metabolites of tetra-, penta- and hexachlorinated biphenyls in male Sprague–Dawley rats. *Chemosphere*, 40:1233-1240
- Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K. and Negishi, M. 1999. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 19:6318-6322.
- Kelly, B.C., Gobas, F.A.P.C. and McLachlan, M.S. 2004. Intestinal absorption and biomagnification of organic contaminants in fish, wildlife, and humans. *Environ. Toxicol. Chem*, 23:2324-2336.
- Kern, P.A., Fishman, R.B., Song, W., Brown, A.D. and Fonseca, V. 2002. The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver. *Toxicology*, 171:117-125.
- Khanjani, N., Hoving, J.L., Forbes, A.B. and Sim, M.R. 2007. Systematic review and meta-analysis of Cyclodiene insecticides and breast cancer. *Journal of Environmental Science and Health*, 25:23-52.
- Khayat, C. B., Costa, E. O. A., Gonçalves, M. W., e Cunha, D. M. D. C., da Cruz, A. S., de Araújo Melo, C. O., et al. 2013. Assessment of DNA damage in Brazilian workers

- occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10):7334-7340.
- Kim, J.H. and Smith, A. 2001. Distribution of organochlorine pesticides in soils from South Korea. *Chemosphere*, 43:137-140.
- Kim, S., Park, J., Kim, H. J., Lee, J. J., Choi, G., Choi, S., et al. 2015. Association between several persistent organic pollutants and thyroid hormone levels in cord blood serum and bloodspot of the newborn infants of Korea. *PLoS One*, 10(5): e0125213.
- Kirsch-Volders, M., and Fenech, M. 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16(1):51-58.
- Knudsen, L. E., and Hansen, Å. M. 2007. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(3):461-470.
- Kokouva, M., Bitsolas, N., Hadjigeorgiou, G.M., Rachiotis, G., Papadoulis, N. and Hadjichristodoulou, C. 2011. Pesticide exposure and lymphohaematopoietic cancers: a case-control study in an agricultural region (Larissa, Thessaly, Greece). *BMC Public Health*, 11:5.
- Kopjar, N., Zeljezic, D., and Garaj-Vrhovac, V. 2006. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta biochimica polonica-english edition-*, 53(2):321-336.
- Koppen, G., Verheyen, G., Maes, A., Gorp, U. V., Schoeters, G., Hond, E. D., et al. 2007. A battery of DNA effect biomarkers to evaluate environmental exposure of Flemish adolescents. *Journal of Applied Toxicology*, 27(3):238-246.
- Korytár, P., Haglund, P., de Boer, J. and Brinkman, U. 2006. Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography for the Analysis of Organohalogenated Microcontaminants. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(4):373-396.
- Kumar, J., Lind, P. M., Salihovic, S., van Bavel, B., Ekdahl, K. N., Nilsson, B., et al. 2014. Influence of persistent organic pollutants on the complement system in a population-based human sample. *Environment international*, 71:94-100.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P. and Jha, A.N. 2009. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol*, 25:53-64.

- Kuzhandaivelu, N., Cong, Y., Inouye, C., Yang, W., Seto, E. 1996. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucl Acids Res*, 24:4741-4750.
- Langer, P., Kocan, A., Tajtáková, M., Susienková, K., Rádiková, Z., Koska, J., et al. 2009. Multiple adverse thyroid and metabolic health signs in the population from the area heavily polluted by organochlorine cocktail (PCB, DDE, HCB, dioxin). *Thyroid research*, 2(1):3.
- Lazar, M. A. 1993. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews*, 14(2):184-193.
- Lee, D. H., Lee, I. K., Steffes, M., and Jacobs, D. R. 2007. Extended analyses of the association between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes. *Diabetes Care*, 30(6):1596-1598.
- Lee, D. H., Porta, M., Jacobs Jr, D. R., and Vandenberg, L. N. 2014b. Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocrine reviews*, 35(4):557-601.
- Lee, D.H., Steffes, M.W., Sjodin, A., Jones, R.S., Needham, L.L. and Jacobs, D.R. Jr. 2010. Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case–control study. *Environmental Health Perspectives*, 118:1235–1242.
- Lee, D.H., Steffes, M.W., Sjodin, A., Jones, R.S., Needham, L.L. and Jacobs, D.R. Jr. 2011. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS One* 6(1):e15977;
- Lee, J.H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M. J., et al. 2010. A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology*; 139(2):653-63.
- Lee, S. L., Thomas, P., Hecker, J., Faunt, J., and Fenech, M. 2015. Chromosomal DNA damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay is significantly associated with cognitive impairment in South Australians. *Environmental and molecular mutagenesis*, 56(1):32-40.
- Levin, M., Morsey, B., Mori, C., and DeGuise, S. 2004. Specific non-coplanar PCB-mediated modulation of bottlenose dolphin and beluga whale phagocytosis upon in vitro exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67:1517–1535.
- Levin, M., Morsey, B., Mori, C., Nambiar, P. R. and De Guise, S. 2005. Non-coplanar PCB mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: a new mechanism for

- immunotoxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(22):1977-1993.
- Li, S., Tian, Y., Ding, Q., and Liu, W. 2014. The release of persistent organic pollutants from a closed system dicofol production process. *Chemosphere*, 94:64-168.
- Lim, J. E., Nam, C., Yang, J., Rha, K. H., Lim, K. M. and Jee, S. H. 2017. Serum persistent organic pollutants (POPs) and prostate cancer risk: A case-cohort study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(5):849-856.
- Lindberg, H. K., Wang, X., Jarventaus, H., Falck, G. C. M., Norppa, H. and Fenech, M. 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 617(1):33-45.
- Londoño Pérez, C., Rodríguez Rodríguez, I., and Gantiva Díaz, C. A. 2011. Cuestionario para la clasificación de consumidores de cigarrillo (C4) para jóvenes. *Diversitas: perspectivas en psicología*, 7(2):281-291.
- Long, M., Deutch, B., Bonefeld-Jorgensen, E.C. 2007. AhR transcriptional activity in serum of Inuits across Greenlandic districts. *Environ Health*, 6:32.
- López-Santiago, N. 2016. La biometría hemática. *Acta pediátrica de México*, 37(4):246-249.
- Lorenzo, Y., Provencio, M., Lombardía, L., Díaz, R., Silva, J., Herrera, M., et al. 2009. Differential genetic and functional markers of second neoplasias in Hodgkin's disease patients. *Clinical Cancer Research*, 15(15):4823-4828.
- Lotti, M. 2003. Pharmacokinetics and blood levels of polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Rev.*, 22:203.
- Lu, C., Wang, Y., Sheng, Z., Liu, G., Fu, Z., Zhao, J., et al. 2010. NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats. *Toxicology Applied Pharmacology*, 248:178-184.
- Luzardo, O. P., Almeida-Gonzalez, M., Henriquez-Hernandez, L. A., Zumbado, M., Alvarez-Leon, E. E., and Boada, L. D. 2012. Polychlorobiphenyls and organochlorine pesticides in conventional and organic brands of milk: Occurrence and dietary intake in the population of the Canary Islands (Spain). *Chemosphere*, 88(3):307-315.
- Mamontova, E. A., Tarasova, E. N. and Mamontov, A. A. 2017. PCBs and OCPs in human milk in Eastern Siberia, Russia: Levels, temporal trends and infant exposure assessment. *Chemosphere*, 178:239-248.

- Mann, K. K., Doerre, S., Schlezinger, J. J., Sherr, D. H. and Quadri, S. 2001. The role of NF-kappaB as a survival factor in environmental chemical-induced pre-B cell apoptosis. *Mol. Pharmacol*, 59(2):302–309.
- Martinez-Aguayo, A., Aglony, M., Bancalari, R., Avalos, C., Bolte, L., Garcia, H., et al. 2011. Birth weight is inversely associated with blood pressure and serum aldosterone and cortisol levels in children. *Clin Endocrinol*, 76:713–718.
- Massart. F., Harrell, J.C., Federico, G. and Saggese, G. 2005. Human breast milk and xenoestrogen exposure: a possible impact on human health. *J Perinatol*, 25:282–8.
- Matheus Lobo, T. y Bolaños, A. 2014. Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2).
- Mathur, V., Bhatnagar, P., Sharma, R.G., Acharya, V. and Sexana, R. 2002. Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from Jaipur. *Environ Int*, 28:331-336
- Mazdai, A., Dodder, N.G., Abernathy, M.P., Hites, R.A., Bigsby, R.M. 2003. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environ Health Perspect* 111:1249-1252.
- McKay, G. 2002. Dioxin characterization, formation and minimization during municipal solid waste (MSW) incineration: review. *Chem. Eng. J.*, 86:343-368.
- McLean, M.R., Bauer, U., Amaro, A.R. and Robertson, L.W. 1996. Identification of catechol and hydroquinone metabolites of 4-monochlorobiphenyl. *Chem Res Toxicol*, 9(1):158–64.
- Mejía, J., Yáñez, L., Carrizales, L., y Díaz-Barriga, F. 2002. Evaluación integral del riesgo en sitios contaminados (una propuesta metodológica). *Scientiae naturae*, 4:25-42.
- Mendrick, D. L. 2008. Genomic and genetic biomarkers of toxicity. *Toxicology*, 245(3):175-181.
- Migliore, L., Petrozzi, L., Lucetti, C., Gambaccini, G., Bernardini, S., Scarpato, R., et al. 2002. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology*, 58(12):1809-1815.
- Miller-Pérez, C., Sánchez-Islas, E., Mucio-Ramírez, S., Mendoza-Sotelo, J., y León-Olea, M. 2009. Los contaminantes ambientales bifenilos policlorinados (PCB) y sus efectos sobre el Sistema Nervioso y la salud. *Salud mental*, 32(4):335-346.
- Miyaji, C. K., Jordao, B. Q., Ribeiro, L. R., Eira, A. F. D. and Cólus, I. M. S. 2004. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes*

- (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1): 108-114.
- Moller, P. 2006. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612(2):84-104.
- Moller, P. and Loft, S. 2006. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA, *Free Rad. Biol. Med.* 41:388-415.
- Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., et al. 2000. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20):15122-15127.
- Morales, J. and Perdew, G. 2007. Carboxyl terminus of hsc70-interacting protein (CHIP) can remodel mature aryl hydrocarbon receptor (AhR) complexes and mediate ubiquitination of both the AhR and the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in vitro. *Biochemistry*, 46:610–621.
- Moreno-Aliaga, M.J. and Matsumura, F. 1999. Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein-alpha in 3T3–L1 cells. *Mol Pharmacol*, 56(1):91-101.
- Mori, C., Morsey, B., Levin, M., Gorton, T. S. and De Guise, S. 2008. Effects of organochlorines, individually and in mixtures, on B-cell proliferation in marine mammals and mice. *Journal Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(4):266–275.
- Morrison, R. T. and Boyd, R. N. 1998. *Química orgánica*. Pearson Educación.
- Muhammad, A.A. 2017. Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge. *Environ Sci Pollut Res.* 24:4223-4227
- Murray, I. A., Patterson, A. D., and Perdew, G. H. 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, 14(12):801-814.
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M. and Rojas Del Castillo, E. 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1).
- Nagayama, J., Tsuji, H., Lida, T., Nakagawa, R., Matsueda, T., Hirakawa, H., et al. 2007. Immunologic effects of perinatal exposure to dioxins, PCBs and organochlorine pesticides in Japanese infants. *Chemosphere*, 67(9):S393-S398.

- NCI (National Cancer Institute). 2017. NCI Dictionary of cancer terms. Consultado el 22 de diciembre de 2017. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=304685>
- Netzahual-Lopantzi, A. 2013. Evaluación ecotoxicológica de sedimentos del río Texcalac y suelos agrícolas ubicados en municipios del noreste de Tlaxcala. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- Nielsen, N.H. and Hansen, J.P. 1980. Breast cancer in Greenland – selected epidemiological, clinical, and histological features. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 98:287-299.
- Novelli, M., S. Piaggi, and De Tata, V. 2005. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *Toxicology Letters*, 156(2):307-314.
- Oakley, G.G., Devanaboyina, U., Robertson, L.W. and Gupta, R.C. 1996. Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol*, 9(8):1285–92.
- Obrenovich E.M., Li, Y., Parvathaneni, K., Yendluri, B.B., Palacios, H.H., Leszek, J., et al. 2011. Antioxidants in health, disease and aging. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 10(2):192-207.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2016. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017). Gráficos y tablas: patrones de crecimiento de la OMS para niños de 5 a 19 años. Obtenida el 15 de diciembre de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2017. Cancer. Datos y cifras sobre el cáncer. Obtenida el 12 de noviembre de 2017, de <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Obtenida el 10 de diciembre de 2017, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1996. Chlorinated paraffins. *Environmental Health Criteria*. Vol. 181. International Program on Chemical Safety. Suiza.
- Ostling, O. and Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1): 291-298.

- Park, J., Cho, S.Y., Lee, S.B., Son, H. and Jeong, H. 2014. Obesity is associated with higher risk of prostate cancer detection in a biopsy population in Korea. *BJU International*, 114:891–895.
- Park, J., Morley, T. S., Kim, M., Clegg, D. J., and Scherer, P. E. 2014. Obesity and cancer-mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(8):455-465.
- Park, S. K., Son, H. K., Lee, S. K., Kang, J. H., Chang, Y. S., Jacobs, D. R., et al. 2010. Relationship between serum concentrations of organochlorine pesticides and metabolic syndrome among non-diabetic adults. *J Prev Med Public Health*, 43(1):1-8.
- Peña, C. E., Carter, D. E. y Ayala-Fierro, F. 2001. Toxicología ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental. In *Toxicología ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental*. The University of Arizona.
- Piperakis, S. M., Petrakou, E., and Tsilimigaki, S. (2000). Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis*, 36(3):243-249.
- Planey, S.L, Kumar, R. and Arnott, J.A. 2014. Estrogen receptors (ERa versus ERb): friends or foes in human biology? *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 34:1–5.
- PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 2005. Instrumental normalizado para la identificación y cuantificación de liberaciones de dioxinas y furanos. (2 ed.). Ginebra, Suiza: IOMC.
- PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 2005. Instrumental normalizado para la identificación y cuantificación de liberaciones de dioxinas y furanos. (2 ed.). Ginebra, Suiza: IOMC.
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Deretzi, G., Zavos, C. and Mantzoros, C.S. 2012. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. *Current molecular medicine*, 12(1):68-82.
- Portillo, J. D., del Barrio, M. T. F., y Salido, F. P. 1997. Aspectos básicos de bioquímica clínica. Ediciones Díaz de Santos.
- Presutti, R., Harris, S. A., Kachuri, L., Spinelli, J. J., Pahwa, M., Blair, A., et al. 2016. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North American Pooled Project. *International journal of cancer*, 139(8):1703-1714.

- Puente, C., and Ramarosan, R. 2006. Medición y análisis de los compuestos orgánicos volátiles en la atmosfera: Últimas técnicas, aplicabilidad y resultados a nivel europeo. *REVISTA ION*, 19(1).
- Puig, T., Porta, R. and Colomer, R. 2009. Fatty acid synthase: a new anti-tumor target. *Medicina Clínica*, 132:359–363.
- Pupo-Balboa, J. B., Gutiérrez-Gutiérrez, R., Pandolfi-Blanco, A., Cásido-Rodríguez, M., Valdés-Ramos, L., y de Armas-Santiesteban, A. 2014. Daño basal del ADN en un grupo de individuos cubanos sanos mediante ensayo Cometa alcalino. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(3):367-373.
- Purdue, M. P., Hoppin, J. A., Blair, A., Dosemeci, M., and Alavanja, M. C. 2007. Occupational exposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *International journal of cancer*, 120(3):642-649.
- Purkey, H.E., Palaninathan, S.K., Kent, K.C., Smith, C., Safe, S.H., Sacchettini, J.C. et al. 2004. Hydroxylated polychlorinated biphenyls selectively bind transthyretin in blood and inhibit amyloidogenesis: rationalizing rodent PCB toxicity. *Chem Biol*, 11:1719-1728.
- Rada, E. C., Ragazzi, M., and Schiavon, M. 2014. Assessment of the local role of a steel making plant by POPs deposition measurements. *Chemosphere*, 110:53-61.
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., and Federico, A. 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(s3): S125-S152.
- Ramos, J., Gavilán, A., Romero, T. and Ize, I. 2011. Mexican experience in local, regional and global actions for lindane elimination. *Environ. Sci. Policy*, 14:503-509.
- Rattenborg, T., Gjermansen, I., and Bonefeld-Jørgensen, E. C. 2002. Inhibition of E2-induced expression of BRCA1 by persistent organochlorines. *Breast Cancer Research*, 4(6):R12.
- Rayne, S., and Forest, K. 2010. pK (a) values of the monohydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs), polybrominated biphenyls (OH-PBBs), polychlorinated diphenyl ethers (OH-PCDEs), and polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs). *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 45(11):1322-46.
- Rocha, M. J., Dores-Sousa, J. L., Cruzeiro, C., and Rocha, E. 2017. PAHs in water and surface sediments from Douro River estuary and Porto Atlantic coast (Portugal) impacts on human health. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(8):425.g

- Rodríguez, S., López, M., Carrillo, G., Salazar, S., Zúñiga, T. y Vázquez, V. 2006. Cuantificación de residuos de plaguicidas en suelos de la comarca lagunera de Coahuila, México. *Agrofaz*, 6:77-84.
- Równicka-Zubik, J., Sułkowski, L., and Toborek, M. 2014. Interactions of PCBs with human serum albumin: In vitro spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124:632-637.
- Rychen, G., Jurjan, S., Fournier, A., Toussaint, H., and Feidt, C. 2013. Exposure of ruminants to persistent organic pollutants and potential of decontamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(10):6440-6447.
- Rylander, L., Nilsson-Ehle, P., and Hagmar, L. 2006. A simplified precise method for adjusting serum levels of persistent organohalogen pollutants to total serum lipids. *Chemosphere*, 62(3):333-336.
- Santamaria-Gómez, A. 2010. Alimento tradicional de la zona sur-oeste del estado de Tlaxcala como fuente de exposición a plomo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Saradha, B., Vaithinathan, S. and Mathur, P.P. 2008. Lindane alters the levels of HSP70 and clusterin in adult rat testis. *Toxicology*, 243:116-123.
- Saradha, B., Vaithinathan, S. and Mathur, P.P. 2009. Lindane induces testicular apoptosis in adult Wistar rats through the involvement of Fas-FasL and mitochondriadependent pathways. *Toxicology*, 255:131–139.
- Sarasin, A. 2003. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2):99-106.
- Schinasi, L., and Leon, M. E. 2014. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *International journal of environmental research and public health*, 11(4):4449-4527.
- Schisterman, E. F., Whitcomb, B. W., Louis, G. M. B., and Louis, T. A. 2005. Lipid adjustment in the analysis of environmental contaminants and human health risks. *Environmental health perspectives*, 113(7):853.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31(1):9-15.
- SEDECO (Secretaría de Desarrollo Económico). 2015. Tlaxcala. Actividad económica. Obtenida el 3 de septiembre de 2015, de <http://www.economia.gob.mx/delegaciones-de-la-se/estatales/tlaxcala#>

- Serdar, B., LeBlanc, W. G., Norris, J. M., and Dickinson, L. M. 2014. Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: a cross-sectional assessment of the NHANES 2003-2004 data. *Environmental Health*, 13(1):114.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., and Wahl, G. M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of cell biology*, 140(6):1307-1320.
- SIEM (Sistema de Información Empresarial Mexicano). 2017. Directorio de establecimientos. Obtenida el 11 de abril de 2017, de <https://www.siem.gob.mx/siem/portal/consultas/respuesta.asp?tamano=0&estado=29&municipio=31§or=1>
- Sigurdson, A. J., Jones, I. M., Wei, Q., Wu, X., Spitz, M. R., Stram, D. A., et al. 2010. Prospective analysis of DNA damage and repair markers of lung cancer risk from the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis*, 32(1):69-73.
- Silins, I. and Hogberg, J. 2011. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health*, 8:629-647.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R. and Schneider, L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*, 175:184-191.
- Sinitsky, M. Y., Minina, V. I., Gafarov, N. I., Asanov, M. A., Larionov, A. V., Ponasenko, A. V., et al. 2016. Assessment of DNA damage in underground coal miners using the cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 31(6):669-675.
- Smith, J. W., Evans, A. T., Costall, B., and Smythe, J. W. 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1):45-60.
- Sojinu, S., Sonibare, O., Ekundayo, O. and Zeng, E. 2012. Assessment of organochlorine pesticides residues in higher plants from oil exploration areas of Niger Delta, Nigeria. *Sci Total Environ*, 433:169-177.
- Song, L., Liu, J., Jin, X., Li, Z., Zhao, M., and Liu, W. 2014. p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene induces colorectal adenocarcinoma cell proliferation through oxidative stress. *PLoS one*, 9(11): e112700.
- Soshilov, A., Pandini, A., Bonati, L. and Denison, M.S. 2006. Characterization of hsp90-binding to the the PASB domain of the Ah receptor. *FASEB J*, 20:A963.

- Srinivasan, A., Lehmler, H.J., Robertson, L.W. and Ludewig, G. 2001. Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci*, 60(1):92–102.
- Sweetman, A. J., Dalla-Valle, M., Prevedouros, K. and Jones, K. C. 2005. The role of soil organic carbon in the global cycling of persistent organic pollutants (POPs): Interpreting and modelling field data. *Chemosphere*, 60:959-972
- Tabb, M.M., Kholodovych, V, Grun, F., Zhou, C., Welsh, W.J. and Blumberg, B. 2004. Highly chlorinated PCBs inhibit the human xenobiotic response mediated by the steroid and xenobiotic receptor (SXR). *Environ Health Perspect*, 112:163-169.
- Tanaka, G.; Kanaji, S.; Hirano, A.; Arima, K.; Shinagawa, A. and Goda, C. 2005. Induction and activation of the aryl hydrocarbon receptor by IL-4 in B cells. *International Immunology*. 17(6):797-805.
- Tang-Péronard, J. L., Heitmann, B. L., Andersen, H. R., Steuerwald, U., Grandjean, P., Weihe, P., et al. 2014. Association between prenatal polychlorinated biphenyl exposure and obesity development at ages 5 and 7 y: a prospective cohort study of 656 children from the Faroe Islands. *The American journal of clinical nutrition*, 99(1):5-13.
- Taylor, K. W., Novak, R. F., Anderson, H. A., Birnbaum, L. S., Blystone, C., DeVito, et al. 2013. Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review. *Environmental health perspectives*, 121(7):774-783.
- Teil, M.J., Blanchard, M. and Chevreuil, M. 2004. Atmospheric deposition of organochlorines (PCBs and pesticides) in northern France. *Chemosphere*, 55:501–514
- ten Tusscher, G.W., Steerenberg, P.A., van Loveren, H., Vos, J.G., Borne, A.E., Von dem, Westra, M., et al. 2003. Persistent hematologic and immunologic disturbances in 8-year-old Dutch children associated with perinatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect*, 111:1519-1523.
- Tharappel, J. C., Lee, E. Y., Robertson, L. W., Spear, B. T. and Glauert, H. P. 2002. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 179:172–184.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, E., Hartmann, A., Kobayashi, H., et al. 2000. Single cell gel/comet assay: guide lines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*, 35:206-221.

- Timbrell, J. A. 1998. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129(1):1-12.
- Torres, A., Espinosa-Reyes, G., Ilizaliturri, C., González, D. J., Razo, I., Mejía, J., y Díaz-Barriga, F. 2006. Diseño y Aplicación de una Metodología para la Evaluación Integrada de Riesgos Ambientales en Sitios Peligrosos de México. Instituto Nacional de Ecología. San Luis Potosí, México.
- Torres-Bugarín, O., y Ramos-Ibarra, M. L. 2013. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2):650-657.
- Torres-Bugarín, O., y Ramos-Ibarra, M. L. 2013. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2):650-657.
- Traynor, J., Mactier, R., Geddes, C.C. and Fox, J.G. 2006. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ* 333(7571):733-737.
- Tryphonas, H. (1995). Immunotoxicity of PCBs (aroclor) in relation to Great Lakes. *Environmental Health Perspectives*, 103(Suppl 9):35-46.
- Tryphonas, H. 2001. Approaches to detecting immunotoxic effects of environmental contaminants in humans. *Environmental health perspectives*, 109(Suppl 6):877-884.
- Tsatsakis, A.M., Tzatzarakis, M.N., Tutudaki, M., Babatsikou, F., Alegakis, A.K. and Koutis, C. 2008. Assessment of levels of organochlorine pesticides and their metabolites in the hair of a Greek rural human population. *Human and Experimental Toxicology*, 27:933–940.
- Ulleras, E., Ohlsson, A., Oskarsson, A., 2008. Secretion of cortisol and aldosterone as a vulnerable target for adrenal endocrine disruption – screening of 30 selected chemicals in the human H295R cell model. *J. Appl. Toxicol.*, 28(8):1045–1053.
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 2004. Initial Actions to be considered on becoming a party to the Stockholm Convention on persistent organic pollutants. Ginebra, Suiza.
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 2010. Convenio de Estocolmo sobre Compuestos Orgánicos Persistentes (COP) enmendado en 2009. Secretaria del Convenio de Estocolmo.
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 2011. Convenio de Estocolmo. Los principales logros de estos 10 años. Ginebra, Suiza.
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 2017a. Obtenida el 29 de agosto de 2017, de

- <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 2017b. The 16 new POPs. Obtenida el 29 de agosto de 2017, de <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>
- Utani, K. I., Kawamoto, J. K., and Shimizu, N. 2007. Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype. *Molecular cancer research*, 5(7):695-704.
- Valle, E. y Cruz, M. G. 1997. Problemática de los bifenilos policlorados (BPC) en México. *Boletín del Instituto de Investigaciones Eléctricas*. Septiembre-Octubre. México.
- Valverde, M. and Rojas, E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. *Mutat Res*. 681:93-109.
- Valvi, D., Mendez, M. A., Garcia-Esteban, R., Ballester, F., Ibarluzea, J., Goni, F., et al. 2014. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and rapid weight gain and overweight in infancy. *Obesity*, 22(2):488-496.
- van den Berg, R., van Vliet, T., Broekmans, W. M., Cnubben, N. H., Vaes, W. H., Roza, L., et al. 2001. A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *The Journal of nutrition*, 131(6):1714-1722.
- Varona-Urbe, M. E., Torres-Rey, C. H., Díaz-Criollo, S., Palma-Parra, R. M., Narváez, D. M., Carmona, S. P., et al. 2016. Exposure to pesticide mixtures and DNA damage among rice field workers. *Archives of environmental & occupational health*, 71(1):3-9.
- Vasavi, M., Vedicherala, B., Vattam, K. K., Ahuja, Y. R., and Hasan, Q. 2010. Assessment of genetic damage in inflammatory, precancerous, and cancerous pathologies of the esophagus using the comet assay. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 14(4):477-482.
- Velasco, A., Hernández, S., Ramírez, M., and Ortíz, I. 2014. Detection of residual organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soil in Rio Verde region of San Luis Potosi, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(7):498-504.
- Villegas, de M. N. 2015. *Medicina del laboratorio. Revisión y actualización*. Amolca. Colombia.

- Vizcaino, E., Grimalt, J. O., Fernández-Somoano, A., and Tardon, A. 2014. Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. *Environment international*, 65:107-115.
- Vizcaino, E., Grimalt, J.O., Lopez-Espinosa, M.J., Llop, S., Rebagliato, M., Ballester, F. 2011. Polybromodiphenyl ethers in mothers and their newborns from a nonoccupationally exposed population (Valencia, Spain). *Environ Int.*, 37:152-7.
- Voet, D., and Voet, J. G. 2006. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.
- Wahlstrom, B. A. 2003. Criteria for additional POPs. In: Fiedler, H. (Ed). *Persistent Organic Pollutants*. Springer Berlin Heidelberg. p. 31-45.
- Wang, H., Ran, J., and Jiang, T. 2014. Urea. In *Urea Transporters*. Springer Netherlands. (p. 7-29).
- Wangpradit, O., Teesch, L.M., Mariappan, S.V., Duffel, M.W., Norstrom, K., Robertson, L.W. et al. 2009. Oxidation of 4-chlorobiphenyl metabolites to electrophilic species by prostaglandin H synthase. *Chem Res Toxicol*, 22(1):64-71.
- Wania, F., and Mackay, D. 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental science and technology*, 30(9):390A-396A.
- Watkins, R.E., Wisely, G.B., Moore, L.B., Collins, J.L., Lambert, M.H., Williams, S.P., et al. 2001. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science*, 292:2329–2333
- Weisglas-Kuperus, N., Patandin, S., Berbers, G.A.M., Sas, T.C.J., Mulder, P.G.H., Sauer, P.J.J. et al. 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ. Health Perspect.* 108, 1203–1207.
- Wesseling, C., Antich, D., Hogsted, C., Rodríguez, A.C., Ahlbom, A. 1999. Geographical differences of cancer incidence in Costa Rica in relation to environmental and occupational pesticide exposure. *Int J Epidemiol.*, 28:365-74.
- Wielsoe, M., Kern, P., and Bonefeld-Jorgensen, E. C. 2017. Serum levels of environmental pollutants is a risk factor for breast cancer in Inuit: a case control study. *Environmental Health*, 16(1):56.
- Wilhelm, C. M., Calsing, A. K., and Da Silva, L. B. 2015. Assessment of DNA damage in floriculturists in southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11):8182-8189.
- Wilson, J., Berntsen, H. F., Zimmer, K. E., Verhaegen, S., Frizzell, C., Ropstad, E., et al. 2016. Do persistent organic pollutants interact with the stress response? *Individual*

- compounds, and their mixtures, interaction with the glucocorticoid receptor. *Toxicology letters*, 241:121-132.
- Wuestermann, P. R., and Cronkite, E. P. 1995. Cell and cell system responses: Physiological and pathophysiological aspects of the immune system contributing to a biomathematical model of lymphocytes. *Stem Cells*, 13(S1):268-275.
- Xu, P., Lou, X., Ding, G., Shen, H., Wu, L., Chen, Z., et al. 2015. Effects of PCBs and PBDEs on thyroid hormone, lymphocyte proliferation, hematology and kidney injury markers in residents of an e-waste dismantling area in Zhejiang, China. *Science of the Total Environment*, 536:215-222.
- Yamashita, N., Taniyasu, S., Petrick, G., Wei, S., Gamo, T., Lam, P. K., et al. 2008. Perfluorinated acids as novel chemical tracers of global circulation of ocean waters. *Chemosphere*, 70:1247-1255
- Yáñez, L., Ortiz-Pérez, D., Batres, L.E., Borja-Aburto, V.H. and Díaz-Barriga, F. 2002. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of México. *Environ. Res.*, 88:174-181.
- Zhang, H., LeCulyse, E., Liu, L., Hu, M., Matoney, L., Zhu, W., et al. 1999. Rat pregnane X receptor: molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 368(1):14-22.
- Zhang, J., and Lazar, M. A. 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annual review of physiology*, 62:439-466.
- Zhang, X., Duan, H., Gao, F., Li, Y., Huang, C., Niu, Y., et al. 2014. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, and nuclear bud frequencies in the peripheral blood lymphocytes of diesel engine exhaust-exposed workers. *Toxicological Sciences*, 143(2):408-417.
- Zhao, C., Xie, H., Zhang, J., Xu, J., and Liang, S. 2013. Spatial distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and effect of soil characters: a case study of a pesticide producing factory. *Chemosphere*, 90(9):2381-2387.
- Zhou, Q., Wang, J., Meng, B., Cheng, J., Lin, G., Chen, J., et al. 2013. Distribution and sources of organochlorine pesticides in agricultural soils from central China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 93:163-170.
- Zitko, V. 2003. Chlorinated pesticides: Aldrin, DDT, endrin, dieldrin, mirex. In Fiedler, H. (Ed.). *The Handbook of Environmental Chemistry Persistent Organic Pollutants*. Springer Berlin Heidelberg (p. 48-90).

Zuñiga, G., and Gómez, B. 2006. La prueba de micronúcleos. Revista de divulgación científica y tecnológica de Universidad Veracruzana, 19(1).

XI. ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



CUESTIONARIO

1. DATOS DE IDENTIFICACIÓN GEOGRÁFICA

Entidad Tlaxcala
Municipio _____
Localidad _____

2. CONTROL DE CUESTIONARIOS

Cuestionario No: _____
Fecha: _____

3. DATOS GENERALES DEL PARTICIPANTE

Nombre: _____
Género: Masculino Femenino
Edad: _____ (años)
Estatura: _____ (m)
Peso: _____ (Kg)

4. DIRECCIÓN DE LA VIVIENDA

Calle, avenida, callejón, carretera, camino

N° Exterior N° Interior

Colonia, Fraccionamiento, Barrio, Unidad habitacional

SECCIÓN 1. DESCRIPCIÓN DE LA RESIDENCIA

5. TIEMPO DE RESIDENCIA

- 2 años
- 2-6 años
- 6-10 años
- Más de 10 años

6. ¿Vive cerca de una zona con actividad agrícola?

- Si ¿Cuál? _____
- No (pase a la pregunta # 8)

7. Aproximadamente ¿qué distancia existe entre su casa y la zona agrícola?

- Menos de 500 metros
- 500-1000 metros
- 1000-3000 metros
- Más de 3000 metros

8. Realiza trabajos de alfarería

- Si
- No

9. ¿Vive cerca de una zona industrial?

- Si ¿Cuál? _____
- No

10. Aproximadamente ¿Qué distancia existe entre su casa y la zona industrial?

- Menos de 500 metros
- 500-1000 metros
- 1000-3000 metros
- Más de 3000 metros

SECCIÓN 2. SALUD Y HÁBITOS

11. ¿Sufre de alguna enfermedad? Mencione ¿cuál enfermedad y cuándo fue diagnosticada?

Si

No

12. ¿Ha consumido algún medicamento en los últimos 3 meses? ¿Consume multivitamínicos?

Si

No

13. ¿Fuma?

Si

No (pase a la pregunta # 15)

14. ¿Con que frecuencia?

1 cigarrillo al mes

1-3 cigarrillos semanales

2-4 cigarrillos diarios

Más de 10 cigarrillos diarios

15. ¿Toma bebidas con alcohol?

Si

No (Pase a la pregunta # 17)

16. ¿Con que frecuencia?

1 vez al mes

1-3 veces al mes

2-3 veces a la semana

17. ¿Consumes drogas?

Si

No

18. ¿Con que frecuencia?

1 vez al mes

1-3 veces al mes

2-3 veces a la semana

SECCIÓN 3. ALIMENTACIÓN

19. ¿Cuántas veces por semana consume verduras?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

20. ¿Cuánta veces por semana consume legumbres?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

21. ¿Cuántas veces por semana consume frutas?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

22. ¿Cuántas veces por semana consume embutidos?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

23. ¿Cuántas veces por semana consume carne?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

24. ¿Cuántas veces por semana consume cereales (tortilla, pan, arroz, avena)?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

25. ¿Cuántas veces por semana consume productos enlatados?

- 1 vez
- 2-4 veces
- 4-6 veces
- Todos los días

SECCIÓN 4. TRABAJO

26. ¿Trabaja actualmente?

- Si
 No

27. ¿Dónde trabaja?

28. ¿Qué actividades desarrolla?

29. ¿Cuánto tiempo ha trabajado en ese lugar?

- Menos de 1 año
 1-3 años
 3-5 años
 5-10 años

ANEXO 2



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



DICTAMEN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Dra. Edelmira García Nieto
Investigador Principal
CIGyA, UATx

Le informamos que el Comité de Bioética de la Facultad de Agrobiología ha evaluado el proyecto denominado “Evaluación genotóxica en una población escolar aledaña al río Texcalac” que desarrollará la estudiante Miriam Acosta Tlapalamatl con matrícula 20102536 y dirigido por Usted. El comité ha resuelto **Aprobar** el proyecto con una vigencia de Marzo 2015 a Junio 2016.

ATENTAMENTE

QFB Luz del Carmen Pérez González
Presidenta del Comité de Bioética
Facultad de Agrobiología



c.c.p. Archivo

ANEXO 3



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**



CONSENTIMIENTO INFORMADO

FOLIO _____

A QUIEN CORRESPONDA

Por este conducto solicito a usted su colaboración para participar en el estudio **“Evaluación genotóxica en una población juvenil de Tlaxcala”** que será realizado por investigadores de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La información que se obtenga será manejada de manera confidencial y anónima. Todos los análisis serán gratuitos.

El proyecto consistirá en una evaluación de la salud a partir de indicadores socioeconómicos, ambientales y de salud, mediante una encuesta que deberá ser contestada por el participante, se registrarán parámetros antropométricos (peso y talla) y se realizará la cuantificación de compuestos orgánicos persistentes, la determinación de micronúcleos, el índice de daño al DNA, así como, una química sanguínea parcial y citometría hemática en muestras de sangre en los jóvenes que acepten participar. Los análisis y el manejo de las muestras serán realizados por personal altamente capacitado. En todo momento se empleará material nuevo y esterilizado.

Agradeciendo su participación, quedo a sus órdenes.

ATENTAMENTE

Dra. Edelmira García Nieto
Coordinadora del proyecto

Dra. Libertad Juárez Santacruz
Coordinadora de la MCSA

Dra. Patricia Limón Huitrón
Coordinadora del CIGyA

FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Nombre y firma del participante