



El Colegio de la Frontera Sur

**Evaluación de la genotoxicidad y su relación con la exposición a  
Contaminantes Orgánicos Persistentes en familias de jornaleros de la  
caña de azúcar en el Sureste de México**

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por:

LBQ. Diego Manuel Hernández Benavides

Enero de 2017



## El Colegio de la Frontera Sur

San Cristóbal de las Casas, Chiapas, 20 de febrero de 2017

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de: **Diego Manuel Hernández Benavides**, hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada: “**Evaluación de la genotoxicidad y su relación con la exposición a Contaminantes Orgánicos Persistentes en familias de jornaleros de la caña de azúcar en el Sureste de México**”, para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural.

Nombre

Firma

Tutor: Dr. Arturo Torres Dosal

\_\_\_\_\_

Asesor: M. en C. David Herrera López

\_\_\_\_\_

Asesor (Externo): Dr. Iván Nelinho Pérez Maldonado

\_\_\_\_\_

Sinodal adicional: Dr. Ernesto Benito Salvatierra Izaba

\_\_\_\_\_

Sinodal adicional: Dra. Rebeca Isabel Martínez Salinas

\_\_\_\_\_

Sinodal suplente: Dr. César Antonio Irecta Nájera

\_\_\_\_\_

## Índice

<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Revisión bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Los contaminantes orgánicos persistentes .....	3
2.1.1 Clasificación.....	5
2.1.2 Efectos en organismos.....	6
2.1.3 Mecanismos de acción tóxica de los COPs sobre el ADN .....	11
2.1.4 Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo en México ....	13
2.1.5 Los COPs en México .....	14
2.1.6 Biomarcadores .....	15
<b>Capítulo 3. Justificación .....</b>	<b>22</b>
3.1 Problema de investigación .....	23
<b>Capítulo 4 Objetivos .....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo General .....	24
4.2 Objetivos específicos .....	24
<b>Capítulo 5. Metodología .....</b>	<b>25</b>
5.1 Selección de los sitios .....	25
5.2 Procedimiento para la obtención de información.....	27
5.3 Recolección de muestras .....	28
5.4 Procedimiento para el análisis de los datos .....	28
5.4.1 Ensayo cometa .....	28
5.4.2 Cuantificación de metabolitos .....	30
5.5 Análisis estadístico.....	31
5.6 Aspectos éticos de la investigación.....	32
<b>Capítulo 6. Resultados .....</b>	<b>33</b>
6.1 Evaluación de daño al ADN por comunidad.....	33
6.2 Evaluación de la exposición a COPs.....	34
6.2.1 COPs no detectados en sangre .....	34
6.2.2 COPs encontrados en sangre.....	35
6.2.3 $\alpha$ -HCH; $\beta$ -HCH; $\gamma$ , $\delta$ -HCH .....	36
6.2.4 $\Sigma$ DDTs .....	38

6.2.5 PCBs.....	41
6.3 Factores sociodemográficos y su relación con los niveles de COPs y daño al ADN .....	41
6.3.1 El lugar de residencia y su relación con los niveles de COPs y daño al ADN	42
6.3.2 El sexo y su relación con los niveles de COPs y Daño al ADN.....	43
6.3.3 La edad y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN.....	43
6.3.4 La ocupación y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN .....	44
6.3.5 La aplicación de plaguicidas y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN.....	45
6.3.6 El consumo de tabaco y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN .....	46
6.3.7 El consumo de alcohol y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN .....	47
6.4 Relación del Daño al ADN con los niveles de la mezcla de COPs.....	48
6.4.1 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs y $\Sigma$ DDTs.....	49
6.4.2 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ DDTs, DDT y DDE .....	50
<b>Capítulo 7. Discusión .....</b>	<b>52</b>
7.1 Daño al ADN por comunidad.....	52
7.2 Niveles de $\Sigma$ COPs .....	53
7.2.1 Niveles de $\Sigma$ HCHs .....	53
7.2.2 Niveles de $\Sigma$ DDTs.....	55
7.2.3 Niveles de PCBs en sangre .....	58
7.3 Factores sociodemográficos y su relación con el daño al ADN y los niveles de COPs.....	59
7.4 Relación del daño al ADN y los niveles de $\Sigma$ COPs (HCHs, DDTs, y PCBs) .....	63
7.4.1 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs y $\Sigma$ DDTs.....	63
7.4.2 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ DDTs, DDT y DDE .....	64
<b>Capítulo 8. Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 9. Perspectivas de investigación .....</b>	<b>70</b>
<b>Capítulo 10. Literatura Citada.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 11. ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## **Dedicatoria**

La presente tesis es dedicada principalmente a Dios por darme salud para lograr mis objetivos y haberme permitido terminar satisfactoriamente el proceso de la Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural en El Colegio de la Frontera Sur.

Dedico esta tesis a mi madre Patricia Benavides López y a mi padre Manuel Hernández que en paz descansa, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor. A toda mi familia que siempre sin condición alguna me han apoyado a lo largo de toda mi vida y nunca se han rendido, en especial a mi abuelita Emma López Pérez a mi abuelito Diego Benavides Ramiro, a mi hermana Blanca Aracely Hernández Benavides, a mi hermano José Antonio Hernández Benavides y a mi sobrino Cristian Alexis Tovilla Hernández.

## **Agradecimientos**

Agradezco principalmente a Dios por permitirme vivir este momento en el cual se refleja todo el esfuerzo y dedicación que se ha tenido a lo largo del periodo estancia de Maestría en El Colegio de la Frontera Sur.

A mi madre Patricia Benavides López y a mi padre Manuel Hernández Martínez (QEPD), por haberme apoyado, con sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por todo su amor brindado desde siempre.

A toda mi familia en especial a mi abuelita Emma López Pérez y mi abuelito Diego Benavides Ramiro que desde el inicio de mi estancia de posgrado me han apoyado incondicionalmente con sus consejos, a mis hermanos Blanca Aracely y José Antonio por su amor y su apoyo ofrecido durante este tiempo.

Agradezco al Dr. Arturo Torres Dosal por creer en mí capacidad para la elaboración de esta investigación y por todo el apoyo brindado desde el inicio de esta investigación. A la Dra. Irene Sánchez Moreno por ser parte de los asesores de esta tesis. A la Dra. Rebeca Isabel Martínez Salinas por el apoyo durante los muestreos realizados para la estandarización de la técnica del ensayo cometa. Al Dr. Iván N. Pérez Maldonado del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la UASLP por brindarme el apoyo en el análisis de la exposición a COPs y asesoría brindada para realizar la presente tesis. A todos mis amigos de posgrado y a mis amigos en San Cristóbal de las Casas, Chiapas quienes hicieron amena la estancia y apoyaron en todo momento para seguir adelante.

Agradezco a El Colegio de la Frontera Sur por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con la beca de Maestría.

Agradezco al CONACYT por el financiamiento del Proyecto de Ciencia Básica “Programa para la evaluación de la genotoxicidad en escenarios impactados por compuestos orgánicos persistentes en el trópico de México”, con la clave CB-2008-01-106050.

*Diego Manuel Hernández Benavides.*

## Resumen

En el presente trabajo se realizó un monitoreo en familias de jornaleros expuestos a Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) en las comunidades de Cárdenas, Huixtla y Chetumal, utilizando biomarcadores de exposición a COPs en sangre mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS), así como la aplicación del biomarcador de genotoxicidad conocido como “ensayo cometa” , para la evaluación del daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los resultados indicaron que la comunidad de Chetumal presentó los mayores niveles de mezcla de COPs al igual que los mayores niveles de daño al ADN en los jornaleros de la caña de azúcar con una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), comparado con las comunidades Control, Cárdenas y Huixtla. Asimismo, se encontró que el (1,1-Dicloro-2,2-bis (4- clorofenil) etileno) DDE principal metabolito del DDT (1, 1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano) fue el compuesto con mayor influencia sobre la fragmentación de la molecular del ADN presentando una correlación estadística significativa ( $P = 0.001$ ,  $r^2 = 0.6146$ ).

Palabras clave: *COPs, Ensayo cometa, Jornaleros, Daño al ADN.*

## Capítulo 1. Introducción

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) son un grupo de agentes químicos producidos sintéticamente, utilizados por el hombre para el control de plagas que dañan la calidad de las cosechas agrícolas y para el control de vectores transmisores de enfermedades como la malaria. Estos compuestos han sido considerados en acuerdos internacionales como el Convenio de Estocolmo que establece los compromisos para su eliminación y/o uso restringido, en este documento los COPs se encuentran agrupados en plaguicidas organoclorados, derivados de la producción industrial y los originados a partir de procesos de combustión industrial (Stockholm Convention on POPs, 2015). Estas sustancias son consideradas como xenobióticos mutagénicos por contener grupos funcionales (cloro o bromo) lo que les confiere propiedades químicas que pueden generar cambios en la estructura de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), causado por el metabolismo de las moléculas principales y la generación de radicales libres (Martínez y Gómez, 2007). Debido a sus propiedades fisicoquímicas y su alta persistencia ambiental, algunos COPs como el 1, 1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano (DDT), Lindano, Bifenilos policlorados (PCBs), Dioxinas y Furanos entre otros, tienen efectos adversos tanto en humanos como en la biota, debido a que estos se bioacumulan y biomagnifican a lo largo de una red trófica (Stockholm Convention on POPs, 2015).

Díaz-Barriga et al. (2003) menciona que los estados del Sur de México son las áreas donde se utilizaron en gran medida algunos COPs como el DDT en las áreas de malaria hasta el año 2000. En este sentido, varios estudios han mostrado anteriormente la contaminación causada por la exposición de la población humana (Yáñez et al., 2002; Pérez-Maldonado et al., 2006; Trejo-Acevedo et al., 2009; Torres-Dosal et al., 2012;



Ruiz-Suárez et al., 2014), alimentos (Gutiérrez et al., 2012; Murga et al., 2016), medio ambiente (Alegria et al., 2004; Alegria et al., 2008; Wong et al., 2008; Wong et al., 2010; Martínez-Salinas et al., 2011) y vida silvestre (Castro-Castro et al., 2005; Charruau et al., 2013; Arrona-Rivera et al., 2016), a niveles de COP en Chiapas, Tabasco y Quintana Roo, México. Sin embargo, son escasos los estudios que evalúan las concentraciones de COPs en muestras ambientales y biológicas y la relación del daño del ADN en los productores rurales de México.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el daño al ADN en PBMC asociado con los niveles de COPs y sus metabolitos en familias de voluntarios dedicados al cultivo de caña de azúcar que viven en Huixtla, Chiapas; Cardenas, Tabasco y Chetumal, Quintana Roo.

## Capítulo 2. Estado del conocimiento

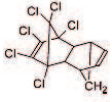
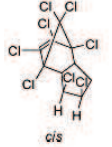
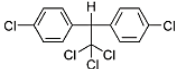
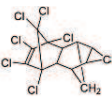
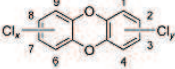
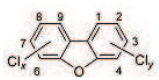
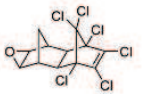
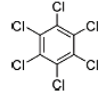
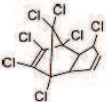
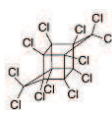
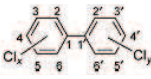
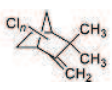
### 2.1 Los contaminantes orgánicos persistentes

Los COPs son sustancias químicas orgánicas, su estructura química está basada en átomos de carbono e hidrogeno además de tener grupos funcionales como cloro y/o bromo. Poseen una combinación particular de propiedades físicas y químicas (cuadro 1) de tal manera que, una vez liberados al ambiente, estos compuestos:

- Son persistentes, permanecen intactos durante períodos excepcionalmente largos de tiempo (el DDT permanece activo durante hasta 30 años), resistiendo a la degradación química, biológica y fotolítica.
- Se pueden distribuir ampliamente en el ambiente, a través del denominado efecto saltamontes, que se origina desde la fuente emisora de los COPs hasta los puntos donde hay exposición para los humanos y la biota. Además, el transporte ambiental de los COPs puede involucrar los movimientos de gases, líquidos y partículas sólidas dentro de un medio determinado y a través de las interfaces entre el aire, el agua, sedimento y suelo. (INECC, 2013c).
- Son bioacumulables, por su propiedad lipofílica, se acumulan en los tejidos grasos de los organismos y se biomagnifican en los organismos encontrando concentraciones más altas en los niveles superiores en la red trófica.

Son altamente tóxicos para los seres humanos y vida silvestre, pueden tener una dosis letal media (DL50) de 20 mg/kg para endrina y de 25 mg/kg para *o-p'* DDT (Ritter, 1995; CEC, 2003; Houde et al., 2008; Smith, 2010; Trejo-Acevedo et al., 2009; INE, 2011; INECC, 2013a; Stockholm Convention on POPs, 2015).

**Cuadro 1.** Propiedades físico-químicas de algunos COPs.

Compuesto	Estructura química	Peso Molecular (g/mol)	Vida media en suelo (años)
Aldrina		365	3-4
Clordano		410	4
DDT		355	15
Dieldrina		381	3-4
PCDDs		322-460 <sup>a</sup>	10-12 <sup>b</sup>
PDCFs		306-444 <sup>c</sup>	
Endrina		381	12
Hexaclorobenceno		285	2.7-5.7
Heptacloro		373	0.75-2
Mirex		546	10
PCBs		189-499	>6
Toxafeno		414	100 días a 12 años

<sup>a</sup>Referencia de Datos de solo siete congéneres tóxicos.

<sup>b</sup>Referencia de datos de TCDD

<sup>c</sup>Referencia solo de diez congéneres tóxicos.

Como resultado de las emisiones continuas al ambiente durante las últimas décadas, los COPs se han distribuido ampliamente en agua y sedimentos de ríos y lagos, en la nieve de las altas montañas, en el Ártico, en la Antártida y algunos COPs en todo el mundo (Carrera et al., 2001; Fu et al., 2003; Zhang et al., 2003; Houde et al., 2008; Wild et al., 2014; Breivik et al., 2016). Esta contaminación extensiva del ambiente y los organismos (incluyendo los alimentos), ha dado lugar a la exposición crónica de diversas especies de fauna durante períodos de tiempo que abarcan generaciones, dando lugar a efectos tóxicos agudos y crónicos dependiendo directamente de las concentraciones de los COPs a las que se han expuestos los organismos (Stockholm Convention on POPs, 2015).

### 2.1.1 Clasificación

En la actualidad el Convenio de Estocolmo enlista 23 COPs agrupados en tres categorías;

- I) **Plaguicidas clorados:** Aldrina; Clordano; Clordecona; Dieldrina; DDT; Endrina; Alfa hexaclorociclohexano ( $\alpha$ -HCH); Beta hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH); gamma hexaclorociclohexano (Lindano o  $\gamma$ -HCH); Hexaclorobenceno; Mirex; Toxafeno; Heptacoloro, Endosulfan e isómeros.
- II) **Compuestos de producción industrial:** Tetrabromodifenil éter y pentabromodifenil éter; Hexabromodifenil éter y heptabromodifenil éter; Ácido perfluooctan sulfónico, sus sales y el fluoruro de perfluorooctan sulfonilo; Pentaclorobenceno; Hexabromobifenilo; y Bifenilos policlorados (PCBs).
- III) **Productos de procesos de combustión o industriales:** Dioxinas y Furanos (Martínez y Ramos, 2010; Stockholm Convention on POPs, 2015).

## **2.1.2 Efectos en organismos**

A continuación se describen algunos de los efectos nocivos relacionados a exposiciones a COPs considerados como plaguicidas organoclorados y PCBs.

### **2.1.2.1 Aldrina y dieldrina**

Estos compuestos se pueden encontrar en el suelo, el agua y sedimentos o en hogares donde se utilizaron para eliminación de termitas, así como en plantas y animales que habitan cerca de tiraderos de desechos peligrosos. Ambos compuestos se encuentran prohibidos en México (INE, 2011). Entre los efectos nocivos que causan a la salud se han observado, alteración de los niveles de estrógeno en el hígado, en los riñones y en el tejido mamario de ratas (Badawi et al., 2000). Kamendulis et al. (2001), reportan una asociación entre el daño al ADN en células hepáticas de ratones en respuesta a una exposición subcrónica durante 90 días a diferentes dosis (1, 3, y 10 mg/Kg/día). También describen el aumento en la duplicidad de los cromosomas de 2N, pasando por 4N, 8N hasta llegar a 16N lo cual está relacionado a la inducción de hepatocarcinogenicidad, el incremento en el índice mitótico y por consiguiente apoptosis celular (ATSDR, 2002).

### **2.1.2.2 DDT**

Este compuesto es un plaguicida organoclorado usado sin restricción en México hasta el año 2000, empleado para controlar insectos en cosechas agrícolas e insectos portadores de enfermedades como la malaria. El DDT y sus metabolitos 1,1-Dicloro-2,2-bis (4- clorofenil) etileno (DDE) y 1,1-Dicloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano (DDD) permanecen en el suelo durante periodos de tiempo mayores a 10 años. En el agua, el DDT se une a partículas orgánicas y se deposita en el sedimento permaneciendo

biodisponible para los organismos (ATSDR, 2008). Su uso está restringido para campañas de salud en México exclusivamente (INE, 2011).

Entre los efectos nocivos relacionados a la salud se han observado: riesgo de defectos congénitos (Salazar et al., 2004), alteraciones endocrinas como: disminución en el ciclo menstrual (Ouyang et al., 2005), disminución de progesterona y estrógenos (Perry et al., 2006), disminución de la fertilidad masculina, (De Jager et al., 2006; Aneck et al., 2007), *Diabetes mellitus* tipo II (Rignell et al., 2007; Persky et al., 2011). Asimismo se ha reportado daño genotóxico relacionado a exposiciones subcrónicas y crónicas como: desregulación epigenética reflejado como daño a la estructura del ADN, bloqueo de la metilación de cromatinas e hipometilación del ADN (Beth et al., 2011); apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) asociada a la generación de radicales libres y el daño por estrés oxidativo (Rojas et al., 1999; Pérez-Maldonado et., 2004; Yáñez et al., 2004; Pérez-Maldonado et., 2005; Pérez-Maldonado et., 2006; Alegría-Torres et al., 2009). Inducción de moléculas proinflamatorias (citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), inducidas ante la exposición a DDE en PBMC *in vitro* (Cárdenas-González et al., 2013). Neurotoxicidad ante una exposición aguda a DDT (Rocha-Amador et al., 2009).

Es relevante indicar que, una vez cuantificados los niveles de la mezcla de  $\Sigma$ DDTs (DDT y DDE), fue importante determinar el coeficiente DDT/DDE, de acuerdo a Tavares et al., 1999, una proporción de DDT/DDE cercana o superior a 1.0 indica que los voluntarios pudieron tener una exposición reciente a DDT, por otro lado la proporción DDT/DDE es menor a 1.0 indica que los voluntarios pudieron tener una exposición antigua a DDT por lo que su principal metabolito se encuentra en mayor proporción o bien posiblemente una exposición reciente a DDE (Tavares et al., 1999). Por

consiguiente, se puede estimar si la exposición en los voluntarios es directamente a DDT o bien a su principal metabolito DDE que se puede encontrar de forma residual adherido a partículas de polvo o suelo (Martínez-Salinas et al., 2011).

### **2.1.2.3 Mirex y clordecona**

Estas sustancias no se encuentran de forma natural en el medio ambiente. El mirex y la clordecona no se volatilizan en forma significativa hacia el aire. Tampoco se disuelven fácilmente en el agua (ATSDR, 1995), el uso de ambos compuestos está prohibido en México (INECC, 2013a). Entre los efectos que causa a la salud se han observado: neurotoxicidad, inmunotoxicidad, déficit reproductivo, daño musculoesquelético, daño en hígado en concentraciones de 1-10 mg/Kg en roedores (UNEP POPRC, 2006). Daño a la estructura del ADN, debido a que estos compuestos inducen cambios en la estructura de los cromosomas, así como cambios de cromátides hermanas, lo anterior fue comprobado en estudios de exposición crónica a clordecona en células germinales de hámster chino (ATSDR, 2012). Además, se ha comprobado la inducción de la replicación temprana del ADN en hepatocitos y la inducción de fragmentación de la hebra sencilla del ADN en células testiculares humanas, por el aumento de actividad hidrolasa en la testosterona (Bjorge et al., 1996; Dai et al., 2001; ATSDR, 2012).

### **2.1.2.4 Alfa, beta y gamma hexaclorociclohexano ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -HCH)**

El hexaclorociclohexano es una sustancia química sintética que hay en ocho formas llamadas isómeros. El isómero más conocido es el gamma-HCH ( $\gamma$ -HCH, lindano), que se utilizó como insecticida en cultivos de frutas, hortalizas y plantaciones forestales, y en animales (AESAs, 2005). Estos compuestos pueden volatilizarse y viajar fácilmente en el aire. También está disponible como un medicamento de prescripción (loción, crema o champú) para tratamiento y/o control de la sarna y los piojos en humanos. En

el aire, el  $\gamma$ -HCH se convierte por fotoquímica en  $\alpha$ -HCH. Ambos isómeros pueden transformarse biológicamente en  $\beta$ -HCH, que es el isómero más persistente en el ambiente (UNEP 2007a; UNEP 2007b; Stockholm Convention, 2008; INE, 2011), en México el Lindano se encuentra en desuso según el INE, sin embargo, su uso puede ser autorizado con casos especiales (INECC, 2013a). Se han reportado diversos efectos a la salud: cáncer de mama relacionado a niveles altos de  $\beta$ -HCH (Mathur et al., 2002), convulsiones en ratas y ratones tras una exposición a altas dosis de  $\gamma$ -HCH (Parmar et al., 2003), incremento de micronúcleos en células (Kalantzi et al., 2004). Daño a la estructura del ADN y carcinógeno (NARAP-HCH, 2006). El principal mecanismo de daño genotóxico por exposición crónica a isómeros HCH es la inducción de aberraciones cromosómicas determinada en células de medula ósea en ratones (ASTRE, 2005).

#### **2.1.2.5 Hexaclorobenceno**

Este compuesto es formado como producto secundario durante la manufactura de sustancias químicas usadas como solventes. Permanece durante periodos de tiempo largos en el ambiente. En el suelo tiene una vida media de 3 a 6 años y no se disuelve fácilmente en agua, la mayor parte permanece asociada con partículas en el fondo de los lagos, ríos o arroyos (ATSDR, 2002). Los principales efectos a la salud que se han reportado incluye: la disminución en la citocina IL-10 de linfocitos con altos niveles de hexaclorobenceno (Belles et al., 2000), disminución de la secreción de inmunoglobulinas por las células plasmáticas (Daniel et al., 2001), disminución de niveles de la hormona tiroidea (Sala et al., 2001). Daño a la estructura del ADN (Rusiecki et al., 2008; Kim et al., 2010).



### **2.1.2.6 Toxafeno**

El toxafeno se degrada muy lentamente en el ambiente, se bioacumula en las redes tróficas acuáticas, se degrada por dechloración y dehidrocloración generando derivados menos clorados. Los congéneres de toxafeno que se han encontrado en peces, mamíferos marinos, y la leche materna y el suero sanguíneo humano son los identificados como p-26, p-40/41, p-44, p-50 y p-62 (ATSDR, 2010). Los principales efectos a la salud reportados incluye: el riesgo de leucemia y una exposición a toxafeno (Mills et al., 2005), la asociación significativa entre la exposición a toxafeno y la activación del citocromo p450 (CYT P450) (Dehn et al., 2005), alteraciones en el sistema endocrino y en los niveles normales hormonales, inducidos por el toxafeno (Kim et al., 2004).

### **2.1.2.7 Bifenilos policlorados (PCBs)**

Son compuestos químicos orgánicos, líquidos, aceitosos o sólidos. En la actualidad hay 209 compuestos clorados individuales de PCBs (conocidos como congéneres) y algunos son volátiles y pueden encontrarse en forma de vapor en el aire. Anteriormente, se usaron como refrigerantes y lubricantes en transformadores, condensadores y en otros artículos eléctricos, sin embargo, actualmente el uso de los PCBs está prohibido. Debido a que los PCBs se bioacumulan en el tejido graso, la exposición humana continúa a través del suministro de alimentos, y la exposición infantil continúa a través de la leche materna contaminada (ATSDR, 2011).

Entre los efectos nocivos que causa a la salud se ha observado: riesgo de linfoma no-Hodgkin por la exposición a los derivados más clorados PCBs 156, 180, 194 (De Roos et al., 2005). Cáncer de próstata provocado por el PCB 153 (Hardell et al., 2006). Enfermedades neurodegenerativas observadas mayoritariamente en mujeres,

esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (Steenland et al., 2006). Efectos negativos en el sistema musculoesquelético (Hodgson et al., 2008). Atrofia del bazo y timo, afectando el sistema inmunológico en recién nacidos (Park et al., 2008). El daño oxidativo al ADN relacionado a PCBs menos clorados (Gupta et al., 2008), daño a la estructura del ADN mediante la activación de genes específicos como los citocromos P450 CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 que inducen la generación de metabolitos tóxicos y radicales libres en el organismo (Schmidt y Bradfield, 1996; Martínez et al., 2002; Denison y Nagy, 2003; Gauger et al., 2007; Rusiecki et al., 2008; Miller-Pérez et al., 2009). Desorden en hormonas endógenas en mujeres post-menopáusicas (Persky et al., 2011).

### **2.1.3 Mecanismos de acción tóxica de los COPs en la salud y las enfermedades asociadas a la toxicidad**

Dependiendo del grado y la forma de exposición (aguda, subaguda, crónica o subcrónica), los agentes químicos pueden afectar negativamente la función y/o la estructura de los organismos vivos. La caracterización cualitativa y cuantitativa de estos efectos nocivos o tóxicos es esencial en una evaluación del riesgo potencial planteado por un agente químico en particular. Una vez que un tóxico entra en el organismo ocurre una serie de pasos para llegar a la toxicidad: i) distribución del tóxico desde el sitio de exposición hasta el órgano blanco; ii) reacción del último metabolito con la molécula diana; iii) disfunción celular y toxicidad resultante; y, iv) reparación y deterioro (Klaassen, 2013). Teóricamente la intensidad de un efecto tóxico depende principalmente de la concentración y persistencia del tóxico final en su sitio de acción. En algunos casos el tóxico final puede ser un metabolito de la molécula principal o especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS o RNS por sus siglas en inglés),

generadas durante la biotransformación de los tóxicos. Las especies reactivas de oxígeno engloban una serie de compuestos reactivos que incluyen el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), todos derivados a través de la reducción de oxígeno molecular mostrado en la cuadro 2 (Klaunig y Kamendulis, 2008).

**Cuadro 2.** Vía para la generación de oxidación intracelular.

<b>Generación de ROS mediante la reducción molecular de oxígeno</b>	
$\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^-$ (anión superóxido)	Una serie de radicales de oxígeno son producidos por la reducción de oxígeno molecular. De los radicales producidos, el radical hidroxilo, el radical hidroperoxilo y el anión superóxido son altamente reactivos y pueden interactuar con las biomoléculas.
$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2^\bullet$ (radical hidroperoxilo)	
$\text{HO}_2^\bullet + e^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ (peróxido de hidrógeno)	
$\text{H}_2\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ (radical hidroxilo)	

Los radicales de oxígeno pueden ser producidos por fuentes exógenas y/o endógenas y pueden ser contrarrestadas con antioxidantes. Las defensas antioxidantes pueden ser enzimáticas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa), y no enzimáticas (vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -carotenos), (Betteridge, 2000; Abuja y Albertini, 2001).

Se han propuesto dos vías metabólicas en la generación de ROS: la activación de los citocromos P450 y la interacción con los complejos de la cadena mitocondrial (Liu et al., 2001; Viswanathan et al., 2003). Las especies reactivas que son producidas por el citocromo P450 están mediadas por los siguientes mecanismos: i) ciclo redox en presencia del oxígeno molecular; ii) oxidaciones de tóxicos de un solo electrón catalizada por la peroxidasa; y, iii) ciclo fútilico de los citocromos P450.

A nivel celular, dentro de la mitocondria, puede haber un porcentaje de oxígeno que se puede convertir en el anión superóxido a través de una reducción de electrones de

oxígeno molecular. El superóxido puede ser dismutado (reducido) por la superóxido dismutasa para producir peróxido de hidrógeno, (Barber y Harris, 1994; Klaunig y Kamendulis, 2008).

#### **2.1.4 Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo en México**

El Convenio de Estocolmo sobre COPs, es un Tratado Internacional, promovido por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), para atender un problema global que deriva de la diseminación de estas sustancias en el ambiente sin respetar fronteras y la necesidad de proteger la salud humana y los organismos acuáticos y terrestres de los daños que puedan ocasionar por sus propiedades tóxicas y capacidad de acumularse en sus tejidos y permanecer en ellos durante años (Plan Nacional de Implementación para la Eliminación de COPs, 2007). En el Convenio de Estocolmo se indican tres tipos de listados:

- a) listado de eliminación de COPs, donde los países que firmaron el Convenio se comprometen a adoptar medidas para eliminar la producción y uso de los COPs;
- b) listado restringido de COPs, en el que los países se comprometen a limitar la producción y uso de los COPs en casos específicos y con objetivos aceptables;
- y,
- c) listado de COPs de producción no intencionada, los países deberán tomar medidas para la reducir las liberaciones de productos no intencionales, con el objetivo de seguir reduciéndolas y, cuando sea viable, eliminarlas definitivamente (Stockholm Convention on POPs, 2015).

México forma parte de los países que han firmado el Convenio de Estocolmo en el año 2001, aprobado por el Senado en el año 2002, y en el año 2003 México ratificó su compromiso con el Convenio de Estocolmo, por lo que a través del Plan Nacional de

Implementación (PNI), México se compromete a realizar estrategias de investigación, monitoreo e identificación de escenarios expuestos a COPs (INECC, 2013b).

### **2.1.5 Los COPs en México**

En México la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso de los siguientes plaguicidas: acetato o propionato de fenil; mercurio; ácido 2, 4, 5-T; aldrina; cianofos; cloranil; DBCP; dialifor; dieldrina; dinoseb; endrina; erbon; formotion; fluoroacetato de sodio (1080); fumisel; kepone/clordecone; mirex/Monuron; nitrofen; schradan; triamifos, está prohibida conforme al Diario Oficial de la Federación del 3 de enero de 1991: (INE, 2011; INECC, 2013b). Asimismo, los plaguicidas autorizados pero cuyo uso ha sido restringido en el catálogo oficial de plaguicidas publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de agosto de 1991 son: el DDT (Por su alto riesgo para la salud humana, su elevada persistencia y sus propiedades de bioacumulación, este plaguicida sólo podrá ser utilizado por las dependencias del ejecutivo en campañas sanitarias); BHC; aldicarb; dicofol; forato; lindano; metoxicloro; mevinfos; paraquat; pentaclorofenol; quintozeno, (INE, 2011; INECC, 2013b).

En años anteriores a 2000 se utilizaron ampliamente los COPs en México en áreas endémicas del paludismo. Por ejemplo, entre 1957 hasta el año 2000 fueron rociadas 65, 545, 400 ton de DDT aplicadas por el programa de control del paludismo en las regiones tropicales de México. Este insecticida se empleó para fumigar paredes y techos al interior y al exterior de las viviendas, así como en cultivos agrícolas. Debido a su persistencia, los humanos pueden seguir expuestos a dosis que se bioacumulan en el cuerpo, llevando a estados clínicos de intoxicación crónica (Stapleton, 1998; Díaz-Barriga et al., 2004). De acuerdo con la Secretaría de Salud de México, entre el año

1990 y 1997 se distribuyó alrededor de 3000 ton/año, sin embargo para el año 2000 se dejó de utilizar el DDT (SSA, 2004).

En algunas áreas del país como el Sureste de México entre las que se encuentran Chiapas, Oaxaca y Tabasco son consideradas zonas endémicas en las que el vector del paludismo se puede reproducir y causar enfermedades, por lo que en las décadas anteriores se utilizó más de 1, 500, 000 toneladas de DDT en las campañas de salud, así como plaguicidas organoclorados (Trejo-Acevedo et al., 2009).

Diversos estudios se han efectuado con la finalidad de monitorear en el sur de México niveles de COPs encontrando en niños niveles de lindano, DDT, DDE, y PCBs (Trejo-Acevedo et al., 2009; Torres-Dosal et al., 2012; Trejo-Acevedo et al., 2012). Asimismo, se detectaron niveles de 58.28 mg/l de DDE en niños de las zonas endémicas de malaria en Chiapas (Herrera-Portugal et al., 2005).

En el Sur de México, se han reportado niveles de COPs (26,067 ng/g de lípidos) más elevados que en otros países como Estados Unidos, Reino Unido, encontrando niveles de DDE 124 ng/g, 2600 ng/g de lípidos respectivamente (CDC, 2005; Trejo-Acevedo et al., 2009). Además en publicaciones recientes se han reportado niveles de COPs residuales en muestras de suelo y polvo de casas en los estados de Chiapas y Tabasco, (Martínez-Salinas et al., 2011; Torres-Dosal et al., 2012). Díaz-Barriga et al. (2003) menciona que en los estados de la frontera Sur de México se encuentran las áreas en donde se utilizó en gran medida algunos COPs como el DDT en zonas de malaria hasta el año 2000.

### **2.1.6 Biomarcadores de exposición a los plaguicidas**

Cuando un contaminante es biodisponible para los organismos y se ha determinado su presencia en tejidos o fluidos biológicos, es importante evaluar si hay efectos biológicos

relacionados con la exposición (Espinosa et al., 2007). Shugart et al. (1992) define a los biomarcadores como “una alteración inducida por un xenobiótico en componentes o procesos, estructuras o funciones celulares o bioquímicas, que es susceptible de medición en un sistema o muestra biológica”. Los biomarcadores suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades y se emplean en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden incluir a seres humanos (Garte y Bonassi, 2005).

Los biomarcadores se clasifican en tres tipos concretos:

- i) Exposición.- se usan para predecir la dosis de un tóxico recibida por un voluntario, el cual puede estar relacionado a cambios como resultado de una enfermedad;
- ii) Efecto.- son medidas bioquímicas, fisiológicas, o alteraciones en el organismo, que dependiendo de su magnitud pueden ser reconocidas como deterioro de la salud o una enfermedad; y,
- iii) Susceptibilidad.- indican el deterioro del estado fisiológico o bioquímico que puede predisponer al voluntario a impactos de agentes químicos, físicos o infecciosos (Espinosa et al., 2007). A nivel individual pueden emplearse para apoyar o rechazar el diagnóstico de un determinado tipo de intoxicación o de otro efecto adverso inducido por productos químicos (Martínez y Gómez, 2007).

Algunos de los biomarcadores de genotoxicidad utilizados en el biomonitoreo de poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas son: aberraciones cromosómicas que detecta cambios citológicamente identificables que afectan al número o a la estructura de los cromosomas que constituyen el cariotipo de la especie; ensayo de micronúcleo con bloqueo de la citocinesis para la detección de agentes que

actúen como clastógenos o aneunógenos; índice mitótico para evaluar citotoxicidad; cinética de proliferación celular para evaluar el efecto citostático de un agente es decir, si un agente interrumpe el ciclo celular normal; el intercambio de cromátides hermanas para detectar inestabilidad cromosómica; la apoptosis celular para determinar la citotoxicidad de un compuesto; y, el ensayo cometa para detectar agentes que interactúen con la molécula del ADN, (Martínez y Gómez, 2007; López et al., 2009).

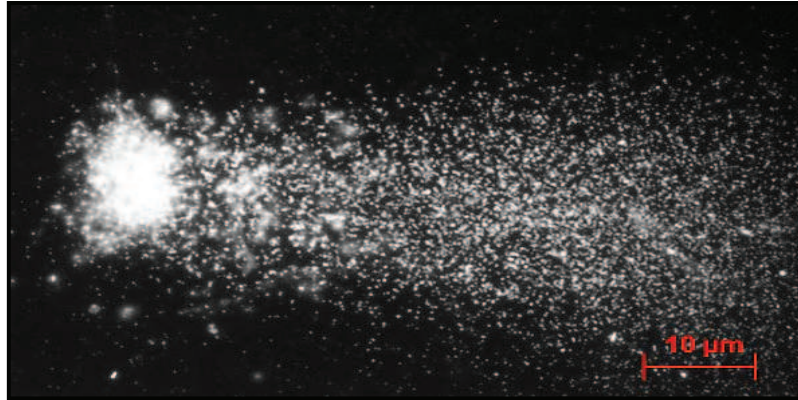
#### **2.1.6.1 Ensayo cometa**

El ensayo cometa es un biomarcador de efecto utilizado frecuentemente para medir la migración de los fragmentos de la doble hélice del ADN como una estimación del daño al ADN ocasionado por la exposición a un tóxico (Ersson y Möller, 2011). El ensayo es una prueba capaz de detectar daños en la estructura del ADN y es aplicable a diversos estudios de biomonitoreo (Dhawan et al., 2009). El ensayo se utiliza ampliamente para detectar en células eucariotas el daño *in vitro* o *in vivo* causado al ADN por agentes genotóxicos, ya sean químicos o físicos (Tice et al., 2000; Collins, 2004). Esta técnica se destaca por su versatilidad y la amplitud de sus posibles aplicaciones en ecotoxicológica (Dhawan et al., 2009). Se caracteriza por ser un método sensible, rápido, sencillo y de bajo costo, además de utilizar una pequeña cantidad de muestra (Dusinska y Collins, 2008). Este grupo de ventajas justifica su amplio uso en la evaluación genotóxica *in vitro* e *in vivo*, de químicos industriales, agroquímicos, fármacos, así como, en el biomonitoreo ambiental y humano (Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003; Hartmann et al., 2004).

El método se basa en la observación de PBMC individuales (como los linfocitos humanos) con la finalidad de evaluar la fragmentación y migración del ADN, ocasionado por el rompimiento del material genético debido a la exposición a xenobióticos. La



migración del material genético (ADN) presente en el núcleo forma una cauda similar a la cola de un cometa (figura 1), con el material genético dañado.



**Figura 1.** Célula positiva para el ensayo cometa capturada con la cámara *Axiocam ICm1* y con ayuda del software *Axiovision Version 4.8.2* en microscopio de Fluorescencia (marca *Karl Zeiss modelo Axio Lab A1*), utilizando un objetivo de 40 X (fuente: propia).

Básicamente, el método se basa en la observación de células mononucleares individuales (linfocitos, eritrocitos, celomocitos) con la finalidad de evaluar la fragmentación y migración del ADN, ocasionado por el rompimiento del material genético debido a la exposición a contaminantes genotóxicos físicos o químicos.

El método de ensayo cometa consiste en siete pasos: i) Preparación de laminillas con las células embebidas en agarosa; ii) Lisis celular para exponer el ADN; iii) Desnaturalización del ADN en solución alcalina ( $\text{pH} > 13$ ) para obtener ADN de hebra sencilla; iv) Electroforesis alcalina ( $\text{pH} > 13$ ); v) Limpieza y neutralización de las laminillas con solución Trizma<sup>®</sup> base; vi) Tinción del ADN y visualización de cometas; y, vii) evaluación de los cometas (Tice et al., 2000; Collins, 2004; Müller et al., 2004; Speit y Hartmann, 2005; Espinosa et al., 2010; Ersson y Möller, 2011).

### 2.1.6.2 Aplicaciones

El ensayo cometa se ha introducido en muchos campos de investigación. Con frecuencia, se utilizan los linfocitos para realizar el ensayo cometa, ya que ofrecen algunas ventajas: pueden ser fácilmente obtenidos (1 ml de sangre contiene de 1 a 3 millones de linfocitos), todos se encuentran en fase G0 o fase de latencia del ciclo celular y poseen una amplia distribución en el organismo ya que hay una recirculación entre la sangre y los tejidos extravasculares.

Esta característica los hace ser apropiados para reflejar los efectos de una exposición en cualquier área del cuerpo. (Müller, 2007).

Se ha reportado que el ensayo cometa tiene diferentes aplicaciones al realizar evaluaciones de daño al ADN como:

- Radiobiología (Olive, 1999, Olive, 2009; Khisroon et al., 2015); biomonitoreo (Faust et al., 2004; Kisby et al., 2009; Paiva et al., 2011; Juárez-Sancatruz et al., 2015);
- Prueba de genotoxicidad *in vitro* (Pérez-Maldonado 2004; Moller, 2005; Alonso-Castro et al., 2012; Geric et al., 2012; Hasan et al., 2012; Alonso-Castro et al., 2016);
- Estudios relacionados con la exposición a COPs en sangre (Pérez-Maldonado et al., 2004; Herrera-Portugal et al., 2005; Pérez-Maldonado et al., 2006; Jasso-Pineda et al., 2015; Franken et al., 2016);
- Genética ecotoxicológica (Dhawan et al., 2009; Espinosa et al., 2010; González-Mille et al., 2010; Mejía-Saavedra et al., 2010; Lee et al., 2013; Caliani et al.,

2014; Ramadass et al., 2016); en plantas, gusanos, tortugas, delfines, peces, anfibios y mamíferos;

- Evaluación del daño al ADN en pacientes con *Diabetes mellitus* tipo 2 (Ibarra, 2010; Persky et al., 2011; Grindel et al., 2016); y,
- Predictor de riesgo de cáncer (Shao et al., 2005; Santoro et al., 2016); y, pruebas de toxicidad para la reproducción (Baumgartner et al., 2009; Pandey et al., 2016; Uppangala et al., 2016).

### **2.1.6.3 Ventajas y desventajas del ensayo cometa**

Una técnica de evaluación del daño del ADN debe ser sensible y cuantitativa, ha de proporcionar datos a nivel individual y debe ser aplicable a poblaciones celulares diversas (Zúñiga, 2009). El ensayo cometa ha demostrado ser una técnica muy sensible a la hora de evaluar daño en el ADN en una amplia variedad de células, dañadas por distintos agentes tanto físicos como químicos (Saghizadeh et al., 2008; Yildiz et al., 2009; Liman et al., 2011; Mazzeo et al., 2013). Permite establecer relaciones dosis-respuesta a bajas dosis, y respecto a otras técnicas genotóxicas como las de aberraciones cromosómicas, o el intercambio de cromátides hermanas, el ensayo cometa ha demostrado una gran sensibilidad detectando entre 50 y 15,000 roturas por célula (Piperakis, 2009).

#### **Ventajas**

Es posible determinar el daño del ADN y la reparación del ADN; el ensayo es rápido y sensible; se necesita poca muestra (<10 mil células); no es necesario el cultivo celular; la proliferación celular no es necesaria, el único requisito es la viabilidad de las células; se puede determinar la distribución de la fragmentación del ADN; y, con la excepción del sistema de análisis de imágenes y el software, los costos son bajos.

## Desventajas

Al momento de evaluar el daño al ADN se deben considerar los factores que pueden inducir la producción de ROS (edad, sexo, dieta alimenticia, sobrepeso, obesidad, diabetes, estrés, exposición a rayos UV, ejercicio físico), ya que pueden alterar la medición del daño genotóxico al aumentar la fragmentación del ADN, si estos factores no son identificados pueden actuar como factores que inducen daño al ADN y al estudiar otros factores de interés pueden causar confusión (Cuadro 3, Anexo I), (Müller, 2007; Moller, 2006).

### **Capítulo 3. Justificación**

En los últimos años en México se han realizado diversos estudios sobre la exposición en humanos en los que se han encontrado niveles de COPs (Díaz-Barriga et al., 2003; Yáñez et al., 2004; Trejo-Acevedo et al., 2009; Pérez-Maldonado et al., 2010; Trejo-Acevedo et al., 2012; Torres-Dosal et al., 2012; Trejo-Acevedo et al., 2013), medio ambiente (aire, suelos, sedimentos) donde se ha comprobado que hay niveles residuales de COPs en regiones rurales (Alegría, 2000; Alegría et al., 2006; Martínez-Salinas et al., 2011; Torres-Dosal et al., 2012).

En otros estudios se han analizado los niveles de daño al ADN mediante el ensayo cometa relacionado a la exposición a COPs en sangre (Pérez-Maldonado et al., 2004; Herrera-Portugal et al., 2005; Pérez-Maldonado et al., 2006).

De acuerdo con algunos autores, los sitios que presentan altos índices de marginación y pobreza son más vulnerables, debido a que viven en condiciones no favorables e incluso insalubres, estos factores pueden representar un mayor riesgo de exposición ocupacional y ambiental a COPs (Díaz-Barriga et al., 2003; Trejo-Acevedo et al., 2009).

En México las comunidades con actividad agrícola han sido poco estudiadas, también se desconocen los niveles de COPs y el efecto relacionado con los mismos en este tipo de escenarios. Un estudio realizado por Torres-Dosal et al. (2012), muestra la presencia de DDT y DDE en plasma de niños y la presencia de ambos de forma residual en suelos de hogares en comunidades con actividad agrícola del cultivo de plátano en el Estado de Tabasco. En el libro publicado por Díaz-Barriga et al. (2003), sobre DDT en México menciona que es importante analizar los niveles de COPs en zonas cañeras, ya que es muy probable encontrar niveles de COPs durante la quema de la caña de

azúcar, probablemente, debido a que se pueden volatilizar nuevamente los COPs, por las altas temperaturas que alcanzan en el suelo.

En el presente trabajo se planteó realizar un estudio de biomonitorio en familias de jornaleros de la caña de azúcar, debido a que el grupo de jornaleros agrícolas de la caña de azúcar es un grupo en el que el uso de los plaguicidas organoclorados y la exposición ambiental no ha sido claramente documentado en este sector laboral y por tanto, se desconocía la magnitud de los efectos que los COPs pudieran tener sobre el ADN humano.

Además, por ser un grupo distribuido en regiones específicas en los estados fronterizos del Sur de México donde se utilizaron COPs para el control de la malaria y posiblemente en el sector agrícola para proteger los cultivos de plagas, el presente estudio muestra un primer acercamiento a la exposición a COPs en los escenarios agrícolas y los efectos de daño al ADN en el grupo de jornaleros de la caña de azúcar.

### **3.1 Preguntas de investigación**

A causa de que se desconoce si la población de estudio presenta niveles de COPs en sangre así como los efectos en el ADN, por lo que se plantearon las siguientes preguntas:

- ¿Hay niveles de COPs en sangre de los voluntarios de estudio?,
- ¿Hay algún daño al ADN de PBMC?,
- ¿Hay relación entre el daño al ADN y los niveles de COPs de los voluntarios de estudio?,
- ¿Todos los COPs aumentan los niveles de daño al ADN en la misma proporción?,

- ¿Hay diferencias entre los niveles de COPs y daño al ADN de las comunidades de estudio?

## **Capítulo 4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

- Evaluar el daño genotóxico y la relación con la exposición ambiental a una mezcla de COPs en las familias de jornaleros de la caña de azúcar residentes en los estados de Chiapas, Tabasco y Quintana Roo.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el daño al ADN en células mononucleares obtenidas de muestras sanguíneas e identificar el grupo que presente mayores niveles de daño al ADN.
- Evaluar la exposición a COPs a partir de la determinación de estos compuestos en muestras de suero de los participantes.
- Evaluar la relación del daño al ADN y la exposición COPs en los participantes y determinar el grupo de mayor riesgo.

## **Capítulo 5. Metodología**

La metodología de la presente investigación se dividió en dos partes:

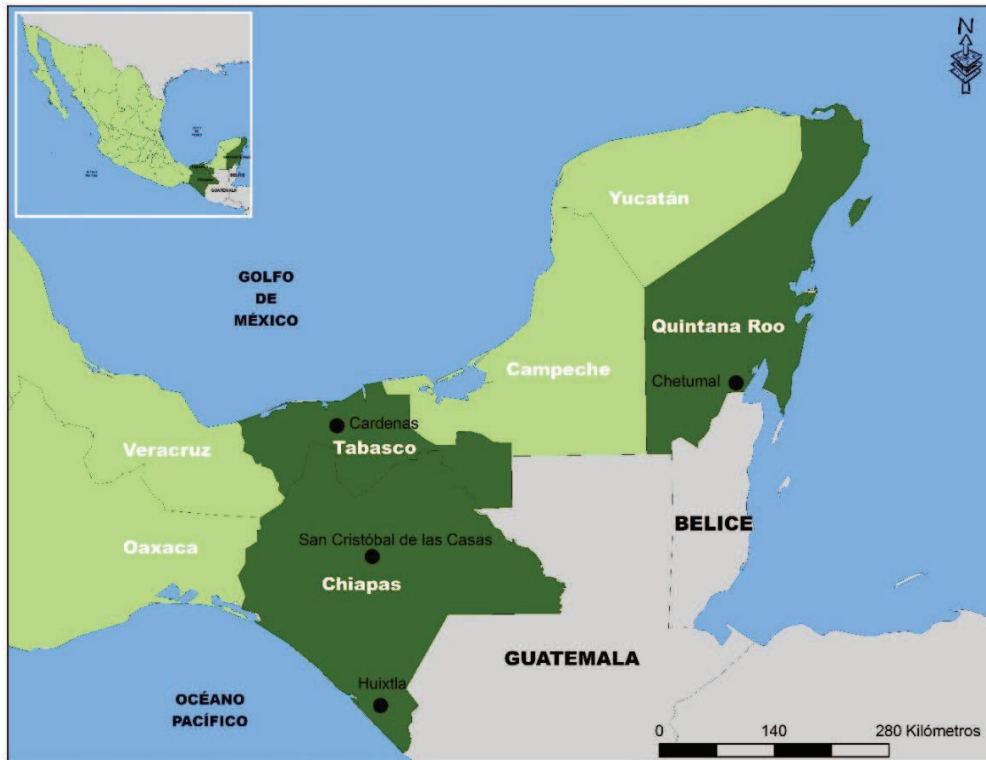
- 1) Se valoró el daño al ADN en PBMC relacionado a una exposición a COPs en voluntarios que viven en escenarios agrícolas de la caña de azúcar impactados (Sureste de México) por algunos COPs.
- 2) Se evaluó la exposición a 13 plaguicidas organoclorados ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -HCH, aldrina, oxiclordano, trans-clordano, trans-nonaclor, cis-nonaclor, p,p'-DDE, p,p'-DDT, mirex, heptacloro epóxido) y 14 congéneres de PCBs (International Union for Pure and Applied Chemistry no. 28, 52, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180, 183, 187) clasificados como COPs presentes en sangre de voluntarios que viven en escenarios agrícolas de la caña de azúcar del Sureste de México y la comunidad control con residentes de un área sin actividad agrícola.

En base a estos análisis se asociaron los factores sociodemográficos (residencia, sexo, edad, ocupación, aplicación de plaguicidas, hábitos de consumo de tabaco y consumo de alcohol) a una mayor incidencia en presentar niveles elevados de COPs y daño al ADN en las diferentes comunidades analizadas para determinar si alguno de estos implica un mayor riesgo de exposición a los COPs y al daño al ADN.

### **5.1 Selección de los sitios**

En la figura 2 se presentan las comunidades de estudio pertenecientes a los Estados de Chiapas, Tabasco y Quintana Roo donde se realizó el monitoreo, la selección de estos sitios fue debido a que en estos Estados se utilizaron en gran medida plaguicidas como el DDT para el control de vectores de malaria y paludismo en el sector de salud pública y el control de plagas en el sector agrícola (Díaz-Barriga et al., 2003; INE, 2011).





**Figura 2.** Localización de los sitios de análisis de exposición a COPs en sangre de voluntarios expuestos en comunidades agrícolas de la caña de azúcar y la comunidad Control. \*Mapa realizado en el Laboratorio de análisis de información geográfica y estadística (LAIGE) ECOSUR-Unidad San Cristóbal, 2013.

Las comunidades seleccionadas fueron identificadas previamente como sitios donde el DDT fue utilizado para el control de la malaria desde los años 1957 a 2000. Los criterios de inclusión de la comunidad fueron: i) que desarrollaran actividades agrícolas de la caña de azúcar; ii) la localización de la comunidad en un área rural del Sureste de México; y, iii) que hubieran rociado DDT durante alguna campaña del sector de Salud Pública en los hogares de estudio. Para la comunidad control, el criterio de inclusión fue que la comunidad no tuviera actividad agrícola cañera y donde los hogares no hayan sido rociados por DDT en los últimos 15 años, asimismo, se tomaron muestras a voluntarios con una media de edad de  $28 \pm 5$  años. Las características de cada comunidad se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Características de los sitios de estudio en el Sureste de México.

<b>Comunidad</b>	<b>Características</b>
Francisco I. Madero, Huixtla, Chiapas (n= 10)	Comunidad rural localizada a 50 msnm en una zona endémica de malaria, con actividad agrícola cañera y actividad pesquera. Presenta una población de 1546 habitantes.
Gral. Plutarco Elías Calles, Cárdenas, Tabasco (n= 17)	Comunidad rural localizada en una zona endémica de malaria y con actividad agrícola de caña de azúcar. Presenta una población de 2149 habitantes.
Carlos A. Madrazo, Chetumal, Quintana Roo (n= 10)	Comunidad rural localizada a 10 msnm en una zona endémica de malaria, con actividad agrícola de caña de azúcar, y con actividad pesquera moderada. Presenta una población de 1769 habitantes.
Comunidad Control, San Cristóbal de las Casas, Chiapas (n= 21)	Comunidad rural localizada a 2120 msnm en una zona con poca actividad agrícola por el tipo de suelo, sin actividad jornalera de la caña de azúcar.

## **5.2 Procedimiento para la obtención de información**

Se aplicó una encuesta a cada voluntario de estudio para obtener los datos sociodemográficos (residencia, sexo, edad, ocupación, jornada laboral, estado de salud entre otros), con el objetivo de conocer si alguno de ellos funciona como factor de exposición a COPs, la encuesta aplicada se muestra en el anexo II.

Para cumplir con la Ley General de Salud, de la Secretaría de Salud y la Investigación para la Salud (2011), a cada encuesta se le asignó un número de folio por lo que la identidad de cada voluntario del estudio fue confidencial.

### **5.3 Recolección de muestras**

Se colectó un total de 37 muestras sanguíneas de los voluntarios pertenecientes familias de jornaleros de tres comunidades con actividad agrícola de la caña de azúcar y 21 muestras a voluntarios de una comunidad sin actividad agrícola de la caña de azúcar ubicadas en el Sureste de México, con el previo consentimiento informado de la población (siguiendo el procedimiento ético) como se presenta en el anexo III.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa en tubos de 6 ml al vacío con heparina como anticoagulante (un tubo por voluntario). De cada tubo se tomaron 300 µl de sangre completa para realizar el análisis del ensayo cometa, el resto de la sangre contenida en el tubo se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min para la separación del plasma y se almacenó en condiciones de oscuridad a -70 °C hasta su procesamiento. Todo el material empleado fue tratado con hexano para la eliminación de impurezas.

### **5.4 Procedimiento para el análisis de los datos**

#### **5.4.1 Ensayo cometa**

La evaluación de daño al ADN se realizó mediante la aplicación de la técnica conocida como “ensayo cometa” (en su versión alcalina Tice et al., 2000), debido a que se necesitó observar la fragmentación de la doble cadena de ADN para evaluar la fragmentación del ADN derivada de la exposición a una mezcla de COPs. En el anexo IV se describe la metodología del ensayo cometa empleada para determinar el daño al ADN.

##### **5.4.1.1 Parámetros utilizados en el ensayo cometa**

Para evaluar el daño causado por la fragmentación del ADN asociada a una exposición a COPs se utilizaron los parámetros reportados por diferentes autores (Tice et al., 2000;

Collins, 2004; Müller et al., 2004; McCauley et al., 2008; Espinosa et al., 2010; Ersson y Möller, 2011):

- i) la longitud de la cola de cometa (Tail length en inglés), se calcula como la diferencia de la longitud total del cometa menos el diámetro de la cabeza del cometa.
- ii) el ADN presente en la cola del cometa (%), se calcula como la intensidad total de la cola del cometa dividida por la intensidad total del cometa multiplicada por 100, la intensidad del cometa es determinada por los pixeles calculados con el software CometScore al calcular el pixalaje total que se generó al excitarse el bromuro de etidio intercalado en los fragmentos del ADN con la ayuda del microscopio de fluorescencia (Tice et al., 2000). Es importante mencionar que el porcentaje del ADN presente en cola del cometa no es proporcional a la longitud de la cola (Arencibia y Rosario, 2010), por esta razón hay otro parámetro:
- iii) El Olive tail moment se calcula al restar el valor de la media del diámetro de la cabeza del cometa menos el valor de la media de la longitud de la cola del cometa multiplicado por el porcentaje de ADN presente en la cola del cometa (OTM por sus siglas en inglés), por tal motivo se eligió este parámetro que representa en mejor forma la cuantificación del daño al ADN para la evaluación del mismo.

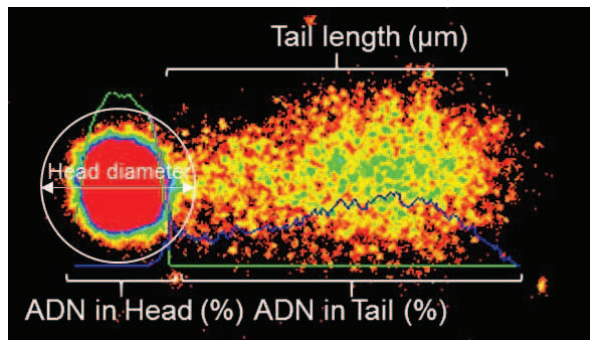
Para obtener el valor del OTM de las muestras analizadas se utilizó la ecuación descrita por Sul et al., (2002).

La ecuación es:

$$\text{OTM} = (\text{Tail.mean} - \text{Head.mean}) \times \text{Tail \%DNA}/100$$

Los valores de Tail mean, Head mean y Tail %DNA se obtuvieron con ayuda del software *CometScore versión 1.5*.

Los parámetros de ADN en cola (%) y longitud de la cola ( $\mu\text{m}$ ), cuantificados en la presente investigación se obtuvieron con ayuda del software *CometScore versión 1.5* (figura 2).



**Figura 2.** Parámetros cuantificables en el ensayo cometa (*Fuente: propia elaborado con el software Triket CometScore versión 1.5*).

#### 5.4.1.2 Análisis del daño al ADN

Para determinar el daño al ADN se valoraron las imágenes obtenidas con el programa *Axiovision 4.8.2*, mismas que se procesaron con programa *CometScore versión 1.5*, posteriormente se evaluaron 100 células mononucleares (50 células por laminilla) a partir de la muestra de cada voluntario. Se recopilaron los parámetros obtenidos de ADN en cola (%), la longitud de la cola ( $\mu\text{m}$ ), posteriormente se determinó el OTM determinados de cada voluntario y se determinó la media de la muestra.

#### 5.4.2 Cuantificación de metabolitos

La identificación y cuantificación de metabolitos de COPs en plasma sanguíneo se realizó mediante la cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) según la técnica descrita por Trejo-Acevedo et al.

(2009), que se realizó con la colaboración del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Los COPs a cuantificar fueron 14 congéneres de PCBs y 12 Plaguicidas Organoclorados (Anexo V).

El Programa Internacional de Aseguramiento de la Calidad a los que está sujeto el laboratorio es:

- Control de calidad para Sangre Humana: estándar certificado de referencia por el NIST, SRM 1958-Organic Contaminants in Fortified Human Serum.

### **5.5 Análisis estadístico**

Con la información generada a partir de los análisis del ensayo cometa en sangre, el análisis de COPs en suero, se realizó un análisis estadístico de los datos de la siguiente manera:

- 1) Se comprobó si las variables dependientes (ADN en cola (%), longitud de la cola ( $\mu\text{m}$ ) olive tail moment, así como los valores correspondientes a la concentración de los COPs analizados) se ajustaban a los criterios de distribución normal con mediante el test de Shapiro-Wilk ( $P < 0.05$  y  $P > 0,05$ ) para seleccionar las pruebas estadísticas paramétricas a realizar (cuadro 10, Anexo VII).
- 2) Se realizó la prueba de Tukey-ANOVA test para la comparación de las medias de los niveles de COPs y daño genotóxico analizados para los factores de comunidad, rango de edad, y ocupación. Asimismo, se realizó la prueba T-Student para los factores obtenidos a partir de la encuesta: residencia; sexo; aplicación de plaguicidas; consumo de tabaco; y, consumo de alcohol.
- 3) Para conocer la relación del daño al ADN y la exposición a los COPs se realizaron pruebas de regresión lineal simple y múltiple para determinar el coeficiente de determinación.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Para elaborar las gráficas se utilizó el programa Systat Software Inc, (2008) Sigmaplot for Windows Version 11.0 Build 11.0.0.77

### **5.6 Aspectos éticos de la investigación**

Para cumplir con los principios de bioética promovidos por el Comité de Ética en la Investigación (CEI) de ECOSUR, la presente investigación fue aprobada por el CEI, siguiendo la normativa establecida para tal fin. Anexando la encuesta y la carta de consentimiento informado que se aplicó a los voluntarios.

## Capítulo 6. Resultados

### 6.1 Evaluación de daño al ADN por comunidad

La información obtenida sobre la integridad del ADN de células mononucleares de sangre periférica de los voluntarios de las comunidades de San Cristóbal de las Casas (Control), Cárdenas, Huixtla y Chetumal mediante la técnica del ensayo cometa, se presenta en el cuadro 5, donde se muestran las medias de los niveles de daño al ADN correspondientes por comunidad.

Los voluntarios de la comunidad de Chetumal presentaron el nivel mayor de daño al ADN más alto seguido de la comunidad Huixtla, Cárdenas y Control, y al momento de comparar la comunidad de Chetumal con Huixtla, Cárdenas y la comunidad Control hay una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Al comparar la comunidad de Huixtla presenta una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) al compararla con la comunidad de Chetumal y la comunidad Control, y no presenta diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) al comparar la comunidad de Huixtla con la comunidad de Cárdenas hay una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.

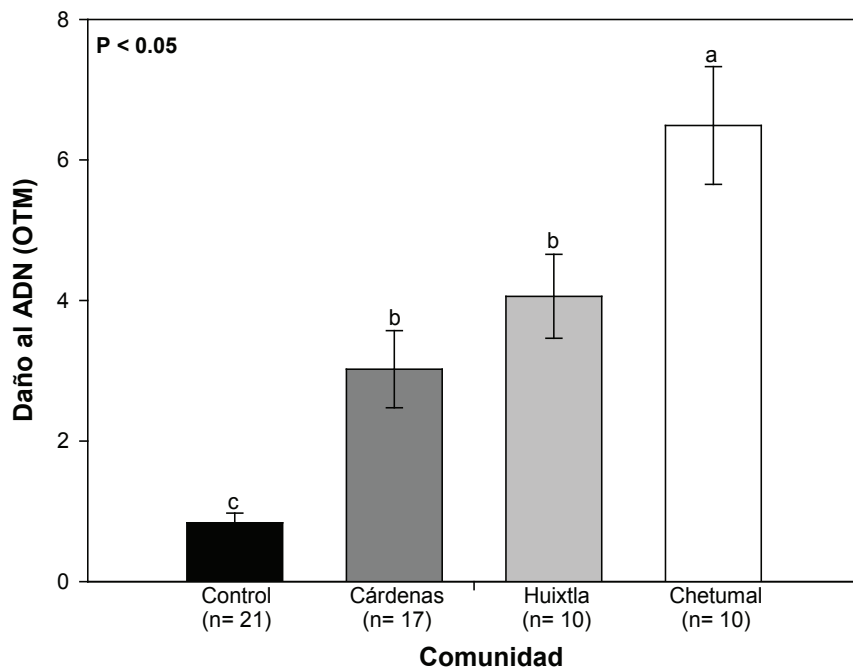
**Cuadro 5.** Daño al ADN en voluntarios participantes.

Comunidad	ADN en cola (%)		Longitud de la cola ( $\mu\text{m}$ )		OTM	
	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.
<b>Control (n=21)</b>	13.06	0.85	12.85	0.66	0.83 <sup>c</sup>	0.13
<b>Cárdenas (n=17)</b>	31.37	2.83	30.16	2.43	3.02 <sup>b</sup>	0.54
<b>Huixtla (n=10)</b>	29.28	2.45	29.47	2.44	4.05 <sup>b</sup>	0.59
<b>Chetumal (n=10)</b>	22.52	1.99	33.18	1.77	6.49 <sup>a</sup>	0.83

$\pm$  E.E. Error estándar. Literales diferentes presentan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) comparado con las comunidades de estudio. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con el de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.



En la figura 4, se presentan las medias de los niveles de daño al ADN en PBMC de los voluntarios de estudio por comunidad, se observó que las comunidades de Chetumal y Huixtla presentan mayor daño al ADN que las comunidades Control y Cárdenas, además al momento de comparar las medias del OTM se observó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.



**Figura 4.** Daño al ADN (OTM) en PBMC de las comunidades analizadas. Literales diferentes presentan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) comparado con las comunidades con actividad agrícola de la caña de azúcar. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.

## 6.2 Evaluación de la exposición a COPs

### 6.2.1 COPs no detectados en sangre

En esa sección se indican los COPs no detectados por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas en las muestras de sangre periférica de los voluntarios de las cuatro comunidades de estudio: aldrina; cis-nonaclor; trans-nonaclor; mirex; heptacloro epóxido; oxiclordano; y, trans-clordano.

### 6.2.2 COPs encontrados en sangre

A continuación, se mencionan los COPs detectados y cuantificados por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas en muestras de sangre periférica de los voluntarios de las cuatro comunidades de estudio: los isómeros  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH (lindano) denominados ( $\Sigma$ HCHs), DDT y su principal metabolito DDE agrupados y presentados como  $\Sigma$ DDTs y los congéneres de PCBs 28; 99; 101; 118; 138; 156; 170; 183; y, 187 agrupados y presentados como  $\Sigma$ PCBs.

Los resultados de los niveles de los COPs en sangre periférica de los voluntarios de las comunidades Control, Cárdenas, Huixtla y Chetumal son presentados en el cuadro 6, como medias de las sumatorias para cada grupo de compuestos ( $\Sigma$ HCHs,  $\Sigma$ DDTs, y  $\Sigma$ PCBs).

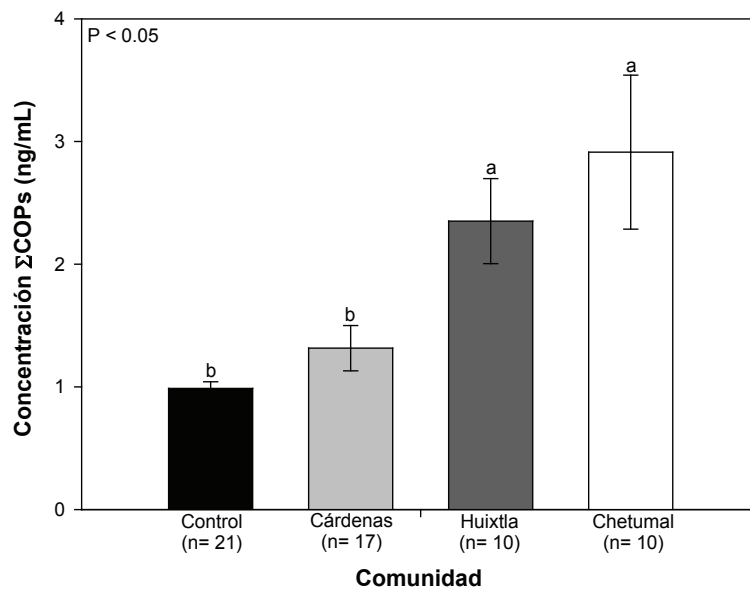
**Cuadro 6.** Niveles de COPs (ng/ml) en sangre de voluntarios de las comunidades de estudio.

Analito	Control (n=21)		Cárdenas (n=17)		Huixtla (n=10)		Chetumal (n=11)	
	Media	$\pm$ EE	Media	$\pm$ EE	Media	$\pm$ EE	Media	$\pm$ EE
$\Sigma$ COPs	0.98 <sup>b</sup>	0.07	1.31 <sup>b</sup>	0.19	2.35 <sup>a</sup>	0.43	2.91 <sup>a</sup>	0.63
$\Sigma$ HCHs	0.03 <sup>a</sup>	0.01	0.01 <sup>b</sup>	0.01	0.02 <sup>ab</sup>	0.01	0.00 <sup>c</sup>	0.01
$\Sigma$ DDTs	0.59 <sup>a</sup>	0.05	0.94 <sup>a</sup>	0.17	1.97 <sup>b</sup>	0.41	2.56 <sup>b</sup>	0.62
$\Sigma$ PCBs	0.36	0.01	0.35	0.01	0.35	0.01	0.34	0.01

N: número de voluntarios de la muestra. Literales diferentes presentan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.

Por otra parte, en la figura 5 se presenta el valor de las medias correspondiente a las concentraciones de la mezcla de  $\Sigma$ COPs en muestras de sangre periférica de las comunidades de estudio. Los resultados indican que los voluntarios de la comunidad de Chetumal son los más expuestos a una mezcla de  $\Sigma$ COPs y, de acuerdo con la prueba de Tukey, estos resultados presentaron una diferencia estadística significativa ( $P <$

0.05) al ser comparados con los niveles de  $\Sigma$ COPs detectados en los voluntarios de las comunidades de Cárdenas y Control, en contraparte no se presentó una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) al ser comparados con los niveles de  $\Sigma$ COPs detectados en los voluntarios de la comunidad de Chetumal con los voluntarios de la comunidad Huixtla. Al mismo tiempo, los valores de  $\Sigma$ COPs detectados en los voluntarios de la comunidad de Huixtla presentaron una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) al momento de ser comparados con los valores de  $\Sigma$ COPs en los voluntarios de las comunidades de Cárdenas y Control.



**Figura 5.** Concentraciones promedio de la mezcla de  $\Sigma$ COPs en sangre en la población de estudio. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), literales diferentes presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA Test.

### 6.2.3 $\alpha$ -HCH; $\beta$ -HCH; $\gamma$ , $\gamma$ -HCH

En el cuadro 7 se presentan los valores de las concentraciones de  $\alpha$ -HCH;  $\beta$ -HCH;  $\gamma$ ,  $\gamma$ -HCH y  $\Sigma$ HCHs en muestras de sangre en los voluntarios de las comunidades de estudio, se observó que los voluntarios de la comunidad de Huixtla presentaron los

valores más elevados para el isómero  $\alpha$ -HCH comparado con los niveles de los isómeros  $\beta$ -HCH y  $\gamma$ -HCH, sin embargo, la comunidad Control presentó una mezcla de  $\Sigma$ HCHs mayor comparada con las comunidades de estudio.

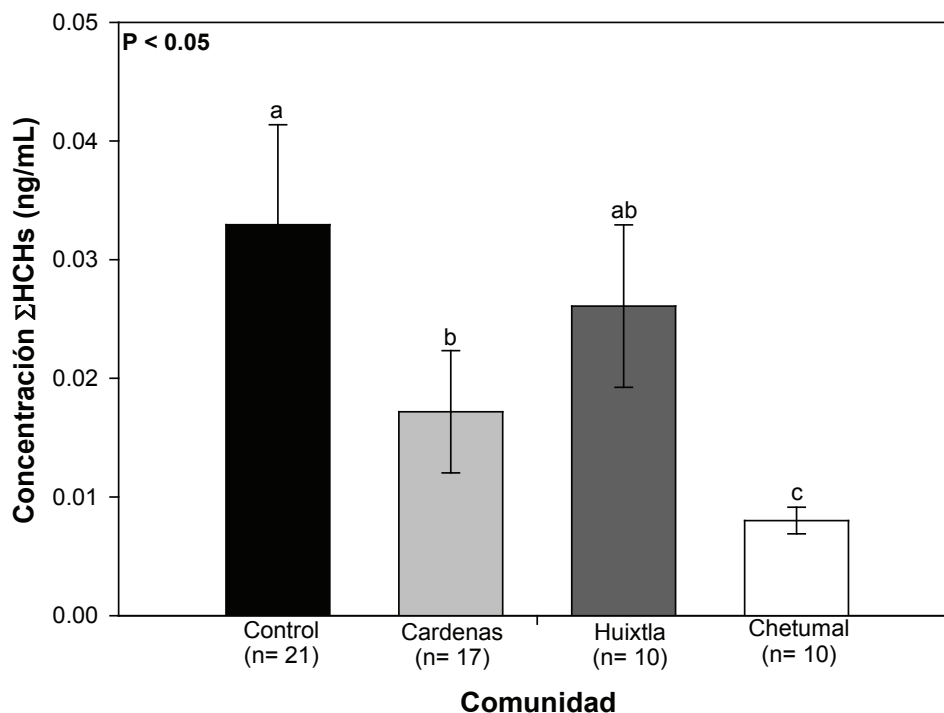
**Cuadro 7.** Niveles de HCHs (ng/ml) en sangre de voluntarios de las comunidades de estudio.

Analito	Control (n=21)		Cárdenas (n=17)		Huixtla (n=10)		Chetumal (n=11)	
	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.
$\alpha$ -HCH	0.0183 <sup>a</sup>	0.0017	0.0143 <sup>b</sup>	0.0043	0.0210 <sup>ab</sup>	0.0052	0.0069 <sup>c</sup>	0.0009
$\beta$ -HCH	0.0066	0.0035	0.0013	0.0002	0.0022	0.0005	0.0008	0.0000
$\gamma$ -HCH	0.0078	0.0041	0.0014	0.0006	0.0027	0.0011	0.0002	0.0000
$\Sigma$ HCHs	0.0327 <sup>a</sup>	0.0093	0.017 <sup>b</sup>	0.0051	0.0259 <sup>ab</sup>	0.0068	0.0079 <sup>c</sup>	0.0009

N: número de voluntarios de la muestra. Literales diferentes presentan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.

Por otro lado, en la figura 6, se presenta el valor de las medias correspondiente a las concentraciones de  $\Sigma$ HCHs en sangre de los voluntarios de las cuatro comunidades de estudio. Se puede observar que en los voluntarios de la comunidad de Control se encuentran expuestos a mayores niveles de  $\Sigma$ HCHs que los voluntarios de las comunidades de Cárdenas, Chetumal y Huixtla. Además, al comparar las medias de los niveles de  $\Sigma$ HCHs de los voluntarios correspondientes a cada comunidad se presentó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre la comunidad Control comparada con las comunidades de Cárdenas y Chetumal acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test, sin embargo, no se presentó una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre la comunidad Control comparada con la comunidad de Huixtla. Asimismo, se encontró que los voluntarios la comunidad Chetumal tienen niveles menores para el grupo de HCHs comparado con los niveles encontrados en los voluntarios de la comunidad

Control, Cárdenas y Huixtla y teniendo en cuenta que presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 6.** Concentraciones promedio de la mezcla de  $\Sigma$ HCHs en sangre en la población de estudio. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), literales diferentes presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA Test.

#### 6.2.4 $\Sigma$ DDTs

Los niveles de las concentraciones de DDE, DDT y  $\Sigma$ DDTs cuantificados en las muestras de sangre periférica de los voluntarios de las cuatro comunidades de estudio son mostrados en el cuadro 8.

Es importante mencionar que, de los compuestos analizados y detectados por GC/MS el grupo de los DDTs presentaron los niveles más altos en sangre comparado con las concentraciones de HCHs y PCBs analizados en las cuatro comunidades de estudio. Los resultados indican que los voluntarios de la comunidad de Chetumal presentaron

mayores niveles de  $\Sigma$ DDTs comparado con los niveles  $\Sigma$ DDTs en los voluntarios de las comunidades de estudio. Los niveles más bajos de  $\Sigma$ DDTs en escenarios con actividad agrícola de la caña de azúcar fueron para los voluntarios de la comunidad de Cárdenas, para la comunidad Control los niveles de  $\Sigma$ DDTs fueron más bajos que las tres comunidades estudiadas.

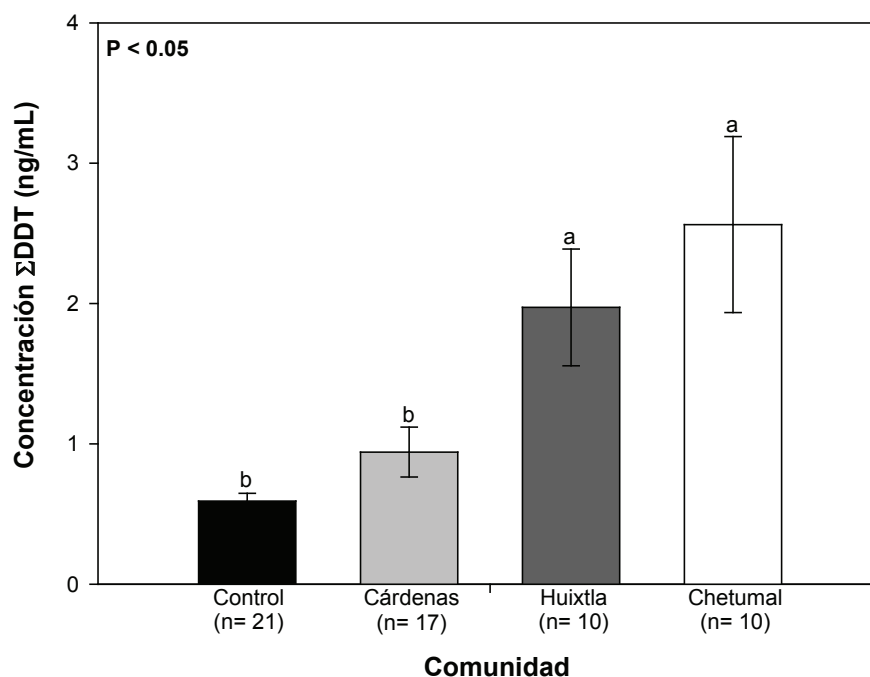
Al mismo tiempo, en el cuadro 8, al momento de analizar el grupo del DDT y sus principales metabolitos se observa que el DDE es el compuesto con niveles más elevados para las cuatro comunidades de estudio, este compuesto presenta niveles de al menos cinco veces mayores a los niveles de DDT en las muestras de sangre periférica de los voluntarios de las cuatro comunidades de estudio.

**Cuadro 8.** Concentraciones de DDTs en suero sanguíneo en voluntarios expuestos y no expuestos ocupacionalmente.

<b>Analito</b>	<b>Control (n=21)</b>		<b>Cárdenas (n=17)</b>		<b>Huixtla (n=10)</b>		<b>Chetumal n=10)</b>	
	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.	Media	$\pm$ E.E.
<b>DDE</b>	0.5670 <sup>b</sup>	0.0565	0.7777 <sup>b</sup>	0.1511	1.4285 <sup>a</sup>	0.3601	2.2130 <sup>a</sup>	0.6328
<b>DDT</b>	0.0251	0.0060	0.1638	0.0143	0.0440	0.0562	0.3494	0.0275
<b><math>\Sigma</math>DDTs</b>	0.5921 <sup>b</sup>	0.0553	0.9415 <sup>b</sup>	0.1780	1.9725 <sup>a</sup>	0.4163	2.5624 <sup>a</sup>	0.6270

Las concentraciones en suero sanguíneo son mostradas en ppb (ng/ml). Los valores son medias  $\pm$  error estándar. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), literales diferentes presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.

La figura 7 muestra que la Comunidad de Chetumal presenta una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), comparado con las comunidades de Cárdenas y Control, la comunidad de Huixtla solamente presenta una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con la comunidad control.



**Figura 7.** Concentraciones promedio de la  $\Sigma$ DDTs en sangre en la población de estudio. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), literales diferentes presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA Test.

#### 6.2.4.1 Coeficiente DDT/DDE

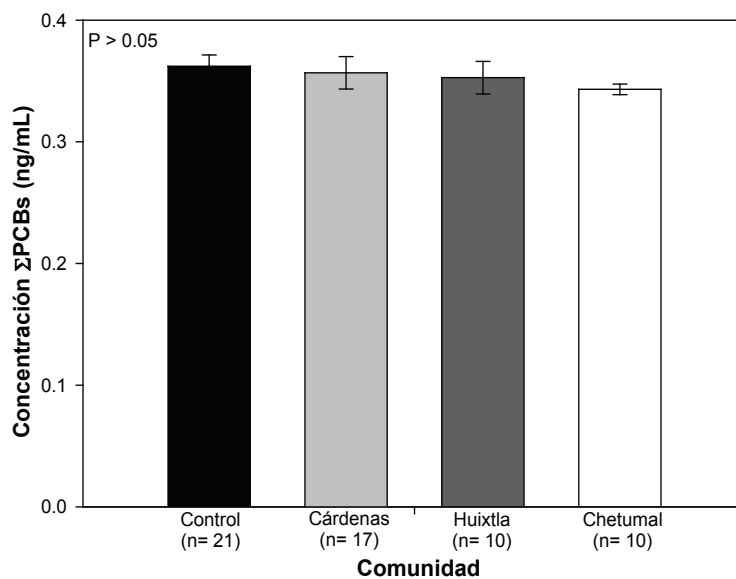
En la presente investigación se encontró una proporción de 0.1958 para Cárdenas como valor máximo encontrado y de 0.0129 como valor mínimo encontrado para la comunidad Control, en general la proporción DDT/DDE fue menor a 1.0 para los valores encontrados en todas las comunidades analizadas como se presenta en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Coeficiente DDT/DDE en muestras de sangre

Comunidad	Coeficiente DDT/DDE
Control	0.0129
Cárdenas	0.1958
Huixtla	0.0235
Chetumal	0.1565

### 6.2.5 PCBs

Al momento de analizar las medias de los niveles de  $\Sigma$ PCBs en sangre en la población de estudio, la figura 8 indica que presentan una exposición mayor a  $\Sigma$ PCBs en la Comunidad Control que en las comunidades de Cárdenas, Huixtla y Chetumal, sin embargo, de acuerdo a la prueba de Tukey ANOVA test las medias de los niveles de  $\Sigma$ PCBs no presentan una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ).



**Figura 8.** Concentraciones promedio de la  $\Sigma$ PCBs en sangre en la población de estudio. No hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test.

### 6.3 Factores sociodemográficos y su relación con los niveles de COPs y daño al ADN

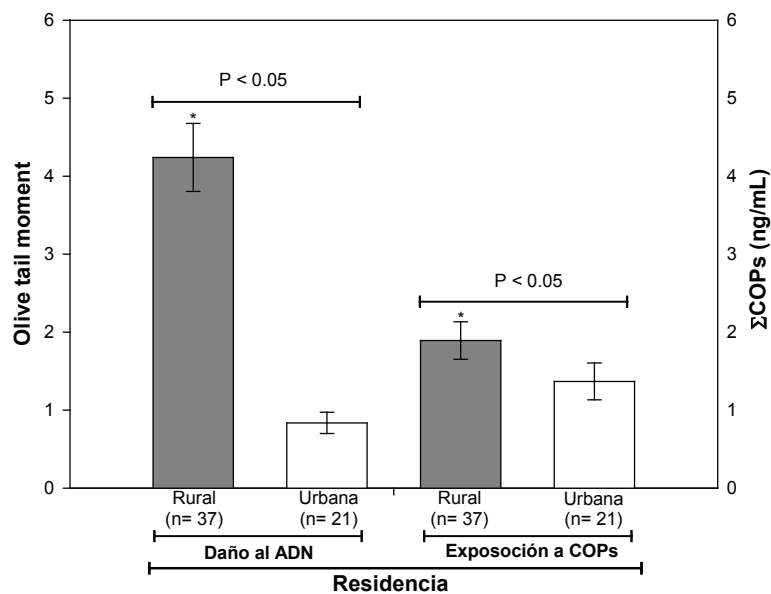
De acuerdo a los datos obtenidos a partir de las encuestas aplicadas a los voluntarios de las comunidades estudio se realizaron pruebas de T-Student Test y Tukey ANOVA Test para conocer el efecto de los factores sociodemográficos: i); lugar de residencia ii) el sexo; iii) los rangos de edad; iv) la ocupación; v) la aplicación de plaguicidas; vi) el



consumo de alcohol; y, vii) el consumo de tabaco, pueden tener sobre la exposición a COPs y el daño al ADN. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los mencionados análisis en donde se comparan los factores con relación al daño al ADN y los niveles de COPs.

### 6.3.1 El lugar de residencia y su relación con los niveles de COPs y daño al ADN

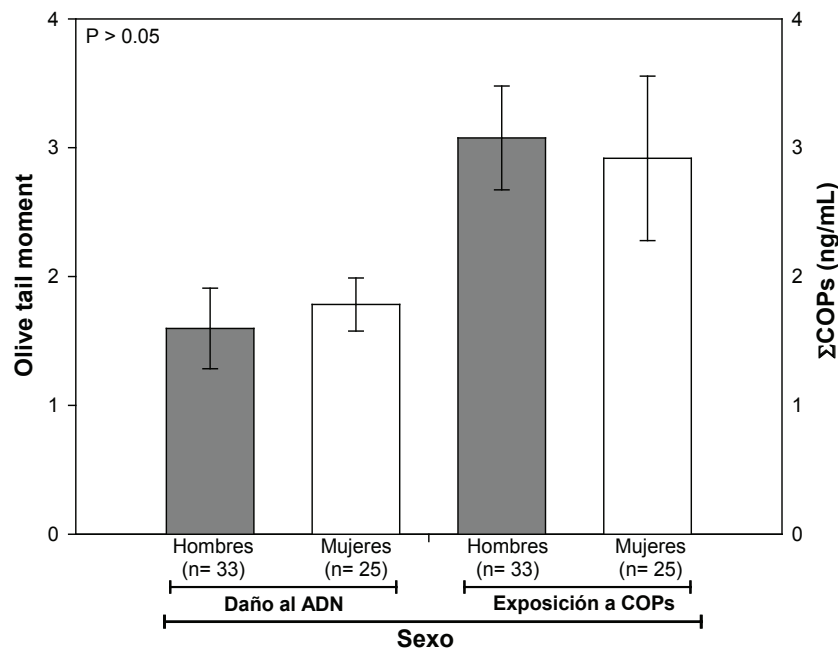
Al comparar el factor del lugar de residencia (rural o urbana) en relación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN detectado en los grupos de voluntarios de estudio, los resultados indican que hay una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test. Por lo que el lugar de residencia es un factor que puede ser determinante en la exposición a  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN en el grupo de los voluntarios que viven en escenarios rurales con actividad agrícola de la caña de azúcar como se presenta en figura 9.



**Figura 9.** Relación del sitio de residencia con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. \* Diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), de acuerdo con la prueba de T-Student test.

### 6.3.2 El sexo y su relación con los niveles de COPs y Daño al ADN

Al comparar el factor del sexo en relación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN detectado en los hombres y las mujeres de los grupos de voluntarios de estudio, los resultados indican que no hay una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA test como se presenta en la figura 10. Por lo que el sexo no es un factor que puede ser determinante en la exposición a  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN en el grupo de los voluntarios de las comunidades de estudio.

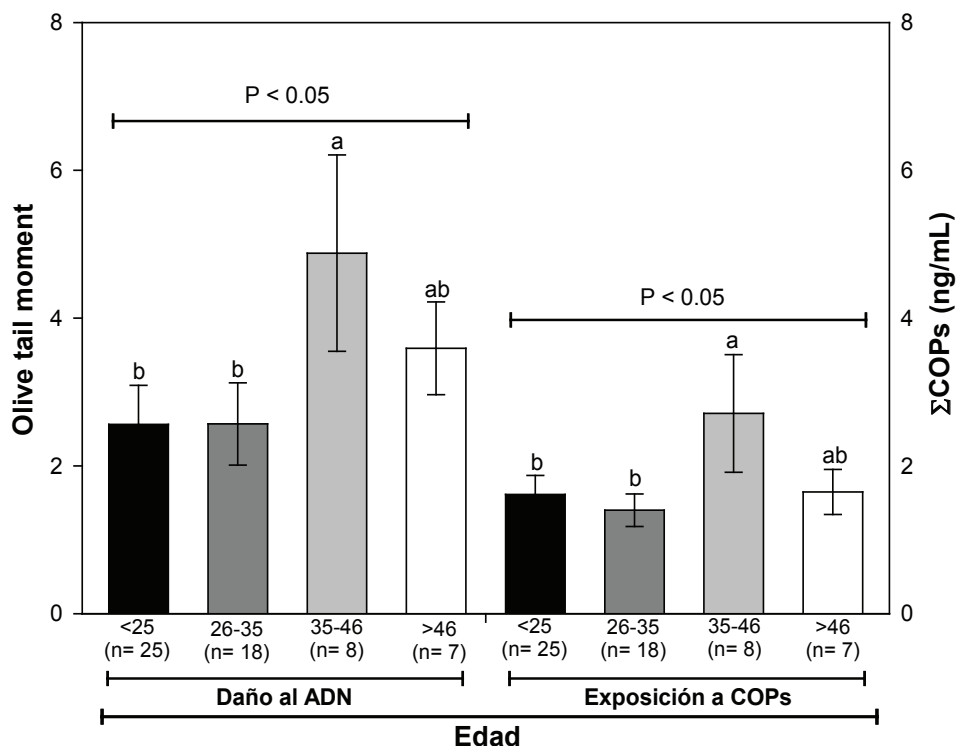


**Figura 10.** Relación del sexo con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. No hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), de acuerdo con la prueba de T-Student test.

### 6.3.3 La edad y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN

El factor de la edad se agrupó en cuatro rangos de edad: i) <25 años; ii) 26 a 35 años; iii) 36-45 años; y, iv) >46 años, para comparar los niveles de COPs y el daño al ADN. El resultado indica que hay una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en entre los

rangos de edad tres y cuatro comparados con los rangos de edad uno y dos, sin embargo, no presentan una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) al comparar el rango de edad tres con el rango de edad cuatro de acuerdo a la prueba de Tukey ANOVA test. De igual manera, los rangos de edad uno y dos no presentan una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) como se presenta en la figura 11.

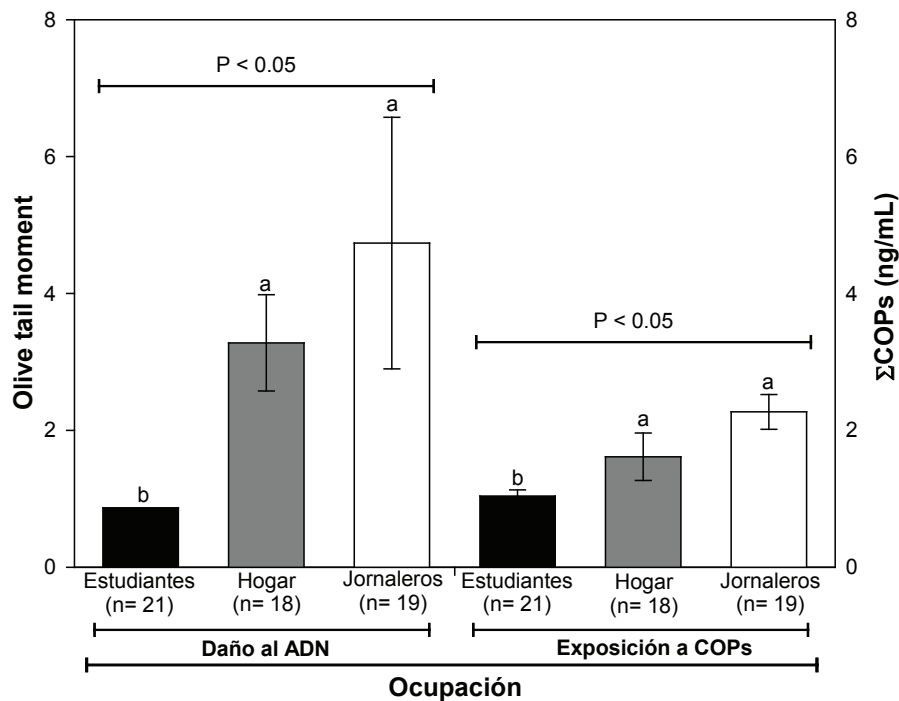


**Figura 11.** Relación de la edad con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), literales diferentes presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA Test.

### 6.3.4 La ocupación y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN

Al comparar el factor de la residencia en relación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN detectado en estudiantes, voluntarios dedicados al hogar y jornaleros de las comunidades de estudio. Al momento de comparar a los voluntarios dedicados a

actividades del hogar y los jornaleros con los estudiantes los resultados indican que hay diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), sin embargo, entre los voluntarios dedicados a actividades del hogar y los jornaleros no hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Tukey ANOVA test como se presenta en la figura 12. Por lo que el factor de la ocupación puede ser determinante en la exposición a COPs.

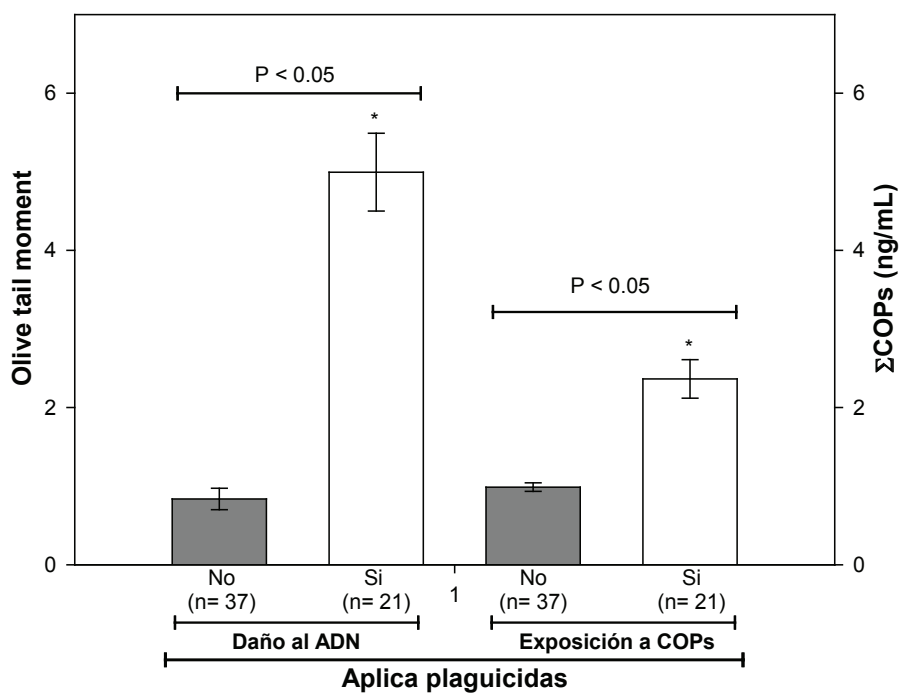


**Figura 12.** Relación de la ocupación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. Literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), literales diferentes presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey ANOVA Test.

### 6.3.5 La aplicación de plaguicidas y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN

Al comparar el factor de la aplicación de plaguicidas en relación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN detectado en los voluntarios de estudio, los resultados indican

que hay una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de T-Student test como se presenta en la figura 13. Por lo que en la aplicación de plaguicidas es un factor que puede ser determinante en la exposición a  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN en el grupo de los voluntarios que viven en escenarios rurales con actividad agrícola de la caña de azúcar.

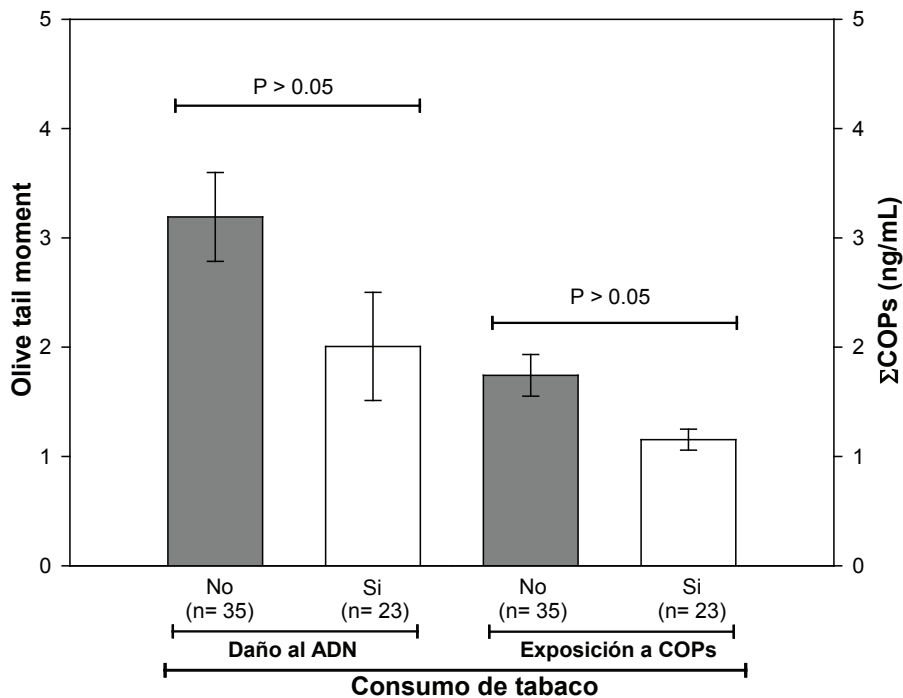


**Figura 13.** Relación de la aplicación de plaguicidas con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. No hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de T-Student Test.

### 6.3.6 El consumo de tabaco y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN

Al comparar el factor del consumo de tabaco en relación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN detectado en los voluntarios de estudio, los resultados indican que no hay una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de T-Student test como se presenta en la figura 14. Por lo que el consumo de tabaco es un factor no

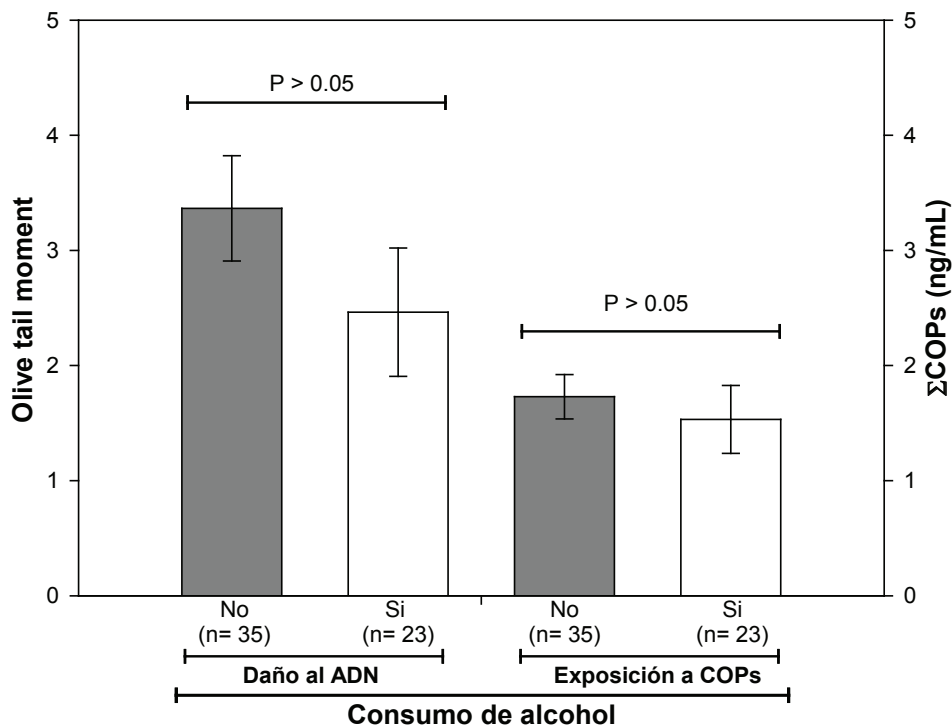
determinante para presentar niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN en el grupo de los voluntarios que viven en escenarios rurales con actividad agrícola de la caña de azúcar.



**Figura 14.** Relación del consumo de tabaco con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. No hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de T-Student Test.

### 6.3.7 El consumo de alcohol y su relación con los niveles de COPs y el Daño al ADN

Al comparar el factor del consumo de alcohol en relación con los niveles de  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN detectado en los voluntarios de estudio, los resultados indican que no hay una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de T-Student test como se presenta en la figura 15. Por lo que el consumo del alcohol es un factor no determinante en la exposición a  $\Sigma$ COPs y el daño al ADN en el grupo de los voluntarios que viven en escenarios rurales con actividad agrícola de la caña de azúcar comparado.

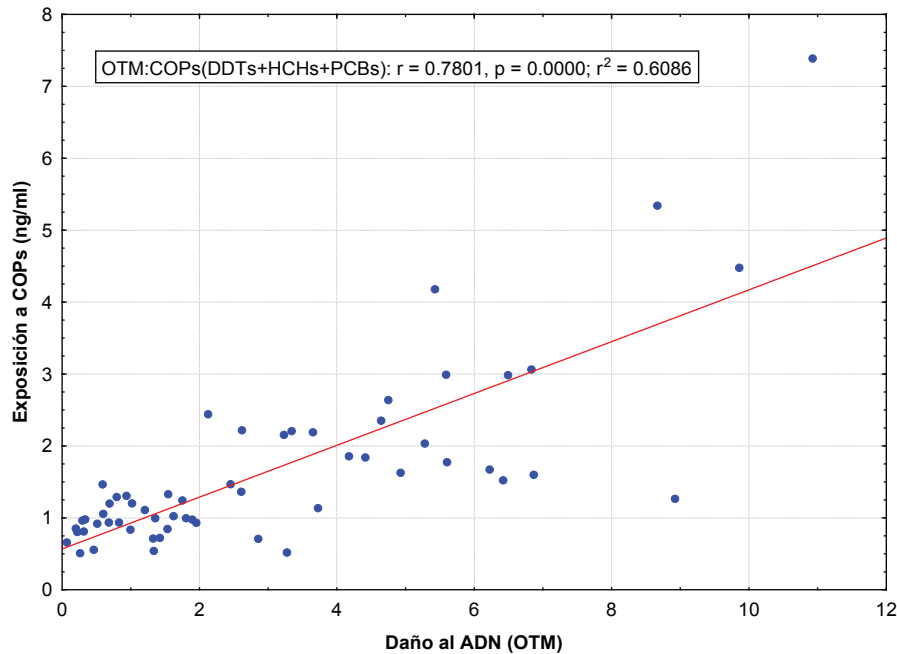


**Figura 15.** Relación del consumo de alcohol con los niveles de  $\Sigma$ COPs y daño al ADN en muestras de sangre periférica de la población de estudio. No hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de T-Student Test.

#### 6.4 Relación del Daño al ADN con los niveles de la mezcla de COPs

Una vez conocido que los voluntarios de las comunidades de estudio presentaron niveles de  $\Sigma$ COPs y daño a la estructura del ADN de PBMC (OTM) se realizó un análisis de regresión lineal simple para explorar y cuantificar la relación entre las variables de los niveles de  $\Sigma$ COPs (variable predictora) y el daño al ADN (variable dependiente) obtenidos a partir de las muestras de sangre periférica de los voluntarios de las cuatro comunidades de estudio. Los resultados presentados en la figura 16 y obtenidos del análisis de regresión lineal indican que el coeficiente de correlación ( $r$ ) es de 0.7801 y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es de 0.6086, este valor indica que el

60.86 % del daño al ADN cuantificado en los voluntarios de estudio puede ser inducido por la exposición a  $\Sigma$ COPs.

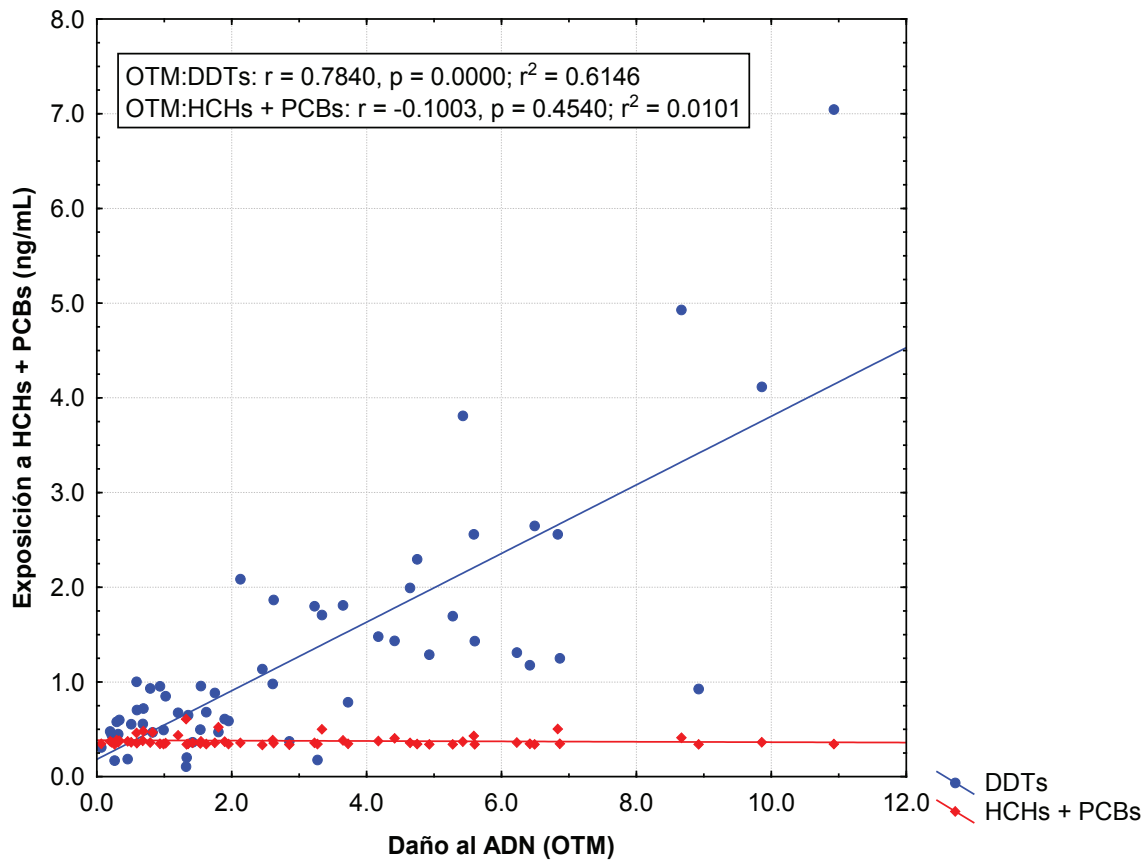


**Figura 16.** Relación del daño al ADN (OTM) en PBMC y los niveles de  $\Sigma$ COPs ( $\Sigma$ DDTs,  $\Sigma$ HCHs y  $\Sigma$ PCBs) en las muestras de los voluntarios de las comunidades de estudio.

#### 6.4.1 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs y $\Sigma$ DDTs

De acuerdo con el análisis de regresión lineal múltiple donde se analizaron los niveles de  $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs y su relación con el daño al ADN los resultados presentados en la figura 17 indicaron un  $r = -0.1003$  y un  $r^2 = 0.0101$ , este resultado indica que los niveles de  $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs no tienen relación directa con el daño al ADN. Al mismo tiempo analizó la relación de los niveles de  $\Sigma$ DDTs con los niveles de daño al ADN de los voluntarios de las comunidades de estudio, donde se obtuvo un  $r = 0.7840$  y un  $r^2 = 0.6146$ , este resultado indica que los niveles de  $\Sigma$ DDTs pueden tener la capacidad de inducir un incremento en los niveles de daño al ADN de células mononucleares de sangre periférica.

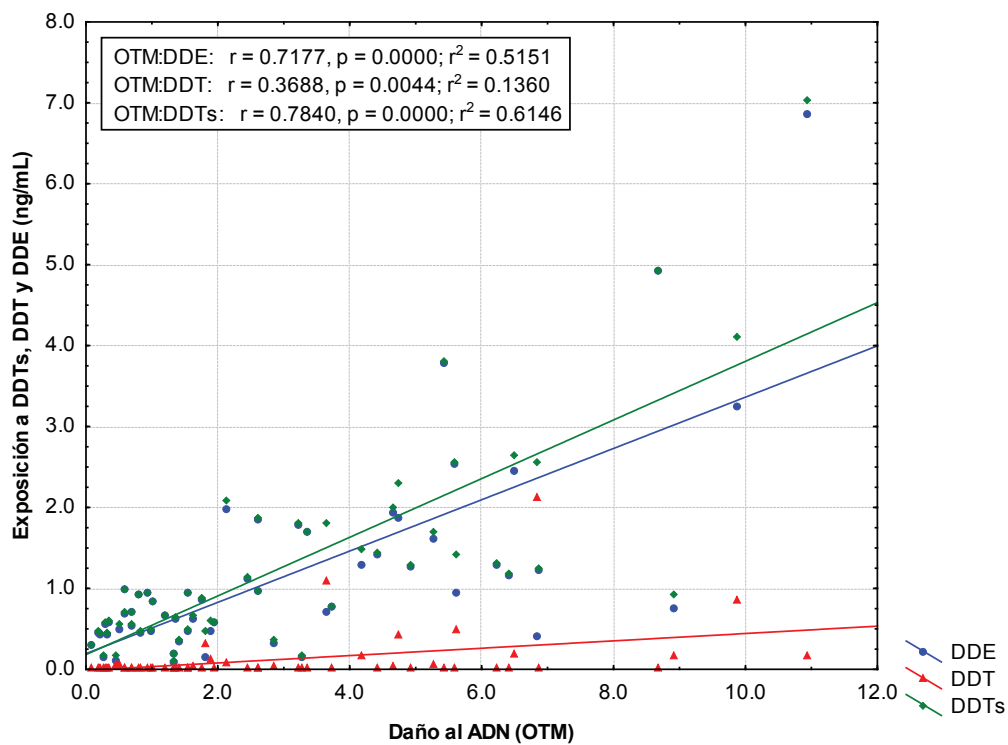




**Figura 17.** Relación del daño al ADN (OTM) en PBMC y los niveles de  $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs y  $\Sigma$ DDTs, en las muestras de los voluntarios de las comunidades de estudio.

#### 6.4.2 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ DDTs, DDT y DDE

Se valoró la relación entre el daño al ADN y los niveles de  $\Sigma$ DDTs (DDT y DDE), y los niveles de  $\Sigma$ DDE y  $\Sigma$ DDT de manera individual para conocer si había un efecto de potencialización de estos compuestos sobre el efecto de daño al ADN, y determinar el compuesto que tiene mayor relación en inducir daño al ADN. Los resultados presentados en la figura 18 revelan una relación de  $\Sigma$ DDTs y daño al ADN con un valor de  $r = 0.7840$  y un  $r^2 = 0.6146$ , la relación entre los niveles de DDT y el daño al ADN un valor de  $r = 0.3688$  y un  $r^2 = 0.1360$ , y la relación entre los niveles de  $r = 0.7177$  y un  $r^2 = 0.5151$ .



**Figura 18.** Relación del daño al ADN (OTM) en PBMC y los niveles de  $\Sigma$ DDTs y DDT y DDE, en las muestras de los voluntarios de las comunidades de estudio.

## **Capítulo 7. Discusión**

### **7.1 Daño al ADN por comunidad**

Los resultados de la valoración del daño al ADN, expresados en unidades de (OTM, cuadro 5) indican que probablemente los voluntarios de la comunidad Control no están expuestos ocupacionalmente a agentes genotóxicos que alteren integridad de la molécula de ADN, por otro lado, los voluntarios de comunidades con exposición ambiental y ocupacional a escenarios con actividad agrícola de la caña de azúcar presentaron un incremento en los niveles de daño al ADN de células mononucleares de sangre periférica, lo que indica que el daño en estos voluntarios puede incrementarse debido a la exposición crónica a agentes genotóxicos.

Es importante mencionar que el presente trabajo representa la primera valoración reportada para este grupo de jornaleros en México y en el mundo, por lo que es de importancia para generar los antecedentes en el área de salud pública. La diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) del grupo Control en relación con los grupos que realizan actividad agrícola de la caña de azúcar del presente trabajo, es similar a la reportada por McKuley et al., (2008); Bhalli et al., (2009) y Kisby et al., (2009), quienes indican que se observó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en jornaleros expuestos a plaguicidas en campos de cultivo de algodón en comparación con un grupo control, así como grupos de jornaleros expuestos a plaguicidas en el cultivo de bayas en comparación con un grupo no expuesto a plaguicidas.

Es importante mencionar que en todas las macromoléculas biológicas se pueden producir alteraciones químicas sin programar debidas a daños de causa ambiental o a errores de la síntesis. En la mayoría de las biomoléculas, como el ARN, las proteínas, y los fosfolípidos de la membrana, los efectos de estas alteraciones se reducen al mínimo

gracias al recambio y a la sustitución de las moléculas alteradas. Sin embargo, el ADN es diferente en este sentido, en cuanto al contenido de su información debe transmitirse de manera prácticamente intacta de una célula otra durante la división celular (Gauger et al., 2007). De tal manera que el ADN necesita de una estabilidad metabólica y esta puede ser de dos tipos: I) mediante un proceso de replicación con una exactitud muy elevada; y, II) mediante mecanismos que corrigen la información genética cuando el ADN se ha dañado. Sin embargo, si la exposición crónica a agentes genotóxicos se puede ver rebasada por la capacidad reparar el ADN de manera normal.

## **7.2 Niveles de $\Sigma$ COPs**

Los niveles de plaguicidas organoclorados y PCBs en suero de los miembros de las familias de jornaleros dedicados al cultivo de la caña de azúcar, así como un grupo de voluntarios control, presentados anteriormente en el cuadro 6, muestra que para las cuatro poblaciones analizadas, no se detectaron niveles en sangre de los compuestos: aldrina, cis-nonaclor, trans-nanoclor, mirex, heptacloro epóxido, oxiclordano, trans-clordano. Los análisis indican que los metabolitos mencionados anteriormente no son detectables en los sitios donde los voluntarios han estado expuestos, esto puede ser el resultado de que en el año 1999 quedó prohibido su uso y aplicación en los campos agrícolas, así como la aplicación que podían tener los mencionados plaguicidas para otros cultivos como el cultivo de algodón o de maíz y no para el cultivo de la caña de azúcar (Díaz-Barriga et al., 2003; Stockholm Convention on POPs, 2015).

### **7.2.1 Niveles de $\Sigma$ HCHs**

Es importante mencionar que el lindano se autorizó para el uso farmacéutico en el control de piojos y liendres (aplicando 1 tonelada por año para este sector en México),

además se calcula que se utilizaron 19 toneladas de lindano por año en el sector agrícola y veterinario (CEC, NARAP-HCH, 2006).

Para el compuesto  $\gamma$ -HCH (lindano), en el presente trabajo los niveles de  $0.0027 \pm 0.0011$  ng/ml, para  $\alpha$ -HCH  $0.0210 \pm 0.0052$  ng/ml y para  $\beta$ -HCH  $0.0022 \pm 0.0005$  ng/ml (cuadro 7), estos niveles fueron mayores a los niveles de la población de Hispanos ( $< \text{LOD}$ ) reportados por el IV NHANES (CDC, 2013). Al analizar los resultados de los niveles de HCHs en las tres comunidades con actividad agrícola de la caña de azúcar, indican que los voluntarios de la comunidad de Huixtla, Chiapas tienen más niveles en sangre de HCHs que los voluntarios de las comunidades de Cárdenas y Chetumal. En el caso particular, el isómero  $\alpha$ -HCH fue el metabolito del grupo de los HCHs presente en las muestras de sangre de los voluntarios en niveles más elevados. Al momento de comparado con los resultados publicados por Trejo-Acevedo et al., (2009), los niveles de  $\Sigma$ HCHs presentados en el cuadro 7 del presente estudio son superiores para el  $\alpha$ -HCH y  $\beta$ -HCH, ya que Trejo-Acevedo et al., (2009) no reportaron niveles detectables para estos isómeros. Además, en estudios recientes de Trejo-Acevedo et al. (2012), mencionan que los niveles para HCHs reportados para el estado de Chiapas son mayores a los niveles encontrados en otros estados de México (Durango; Guanajuato; Michoacán; San Luis Potosí; Querétaro; Veracruz; Zacatecas).

El aumento en  $\Sigma$ HCH encontrado en el presente trabajo puede deberse a que en la forma técnica en que se comercializó el HCH contenía alrededor del 60-70 % de  $\alpha$ -HCH, 5-12 % de  $\beta$ -HCH y 10-15 % de  $\gamma$ -HCH (CEC, NARAP-HCH, 2006). Es importante mencionar que el  $\alpha$ -HCH fue clasificado como un posible carcinógeno en humanos por la Environmental Protection Agency (EPA) y la International Agency for Research on Cancer (IARC), (CEC, NARAP-HCH, 2006). Además, la toxicidad de los isómeros de

HCHs varía, con respecto a una exposición aguda el  $\gamma$ -HCH es el más tóxico seguido del  $\alpha$ -,  $\delta$ - y  $\beta$ -HCH, para una exposición crónica, sin embargo, el  $\beta$ -HCH es el isómero más tóxico seguido del  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ - HCH. En general, los isómeros HCHs y los productos que se forman en el cuerpo a partir de ellos pueden ser almacenados temporalmente en la grasa corporal (ASTDR, 2005; CEC, NARAP-HCH, 2006). El  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH y los productos que se forman a partir de ellos en el cuerpo se excretan más rápidamente en la orina. Por lo que se puede presumir que la exposición a HCHs en la población es reciente de acuerdo con la relación obtenida de  $\gamma$ -HCH/ $\alpha$ -HCH 1 a 7.

### **7.2.2 Niveles de $\Sigma$ DDTs**

La exposición a COPs en la comunidad de Chetumal presentó los niveles más elevados como mezcla de COPs comparada con la comunidad de Cárdenas y Control pero no con la comunidad de Huixtla. Estos resultados son similares a los reportados por (Pérez-Maldonado et al., 2006) quien analizó DDTs, DDT, DDE y DDD en las comunidades de El Ramonal, Quintana Roo; La Cigüeña, Chiapas; y, La Ventanilla, Oaxaca, donde reportaron los mayores niveles de DDTs para el estado de Quintana Roo.

Esto puede ocasionarse que en México el DDT fue muy utilizado en el sector salud pública en programas para el control de la malaria y en la agricultura para proteger de plagas las cosechas (Díaz-Barriga, 2003), por lo que se ha reportado en otros estudios la exposición humana a diversos COPs en diferentes comunidades en México lo que indica que a pesar de que algunos de los COPs están prohibidos o restringidos estos siguen en niveles residuales en el ambiente por lo que algunos organismos y el ser humano aún pueden presentar niveles corporales de COPs (Díaz-Barriga et al., 2003; Salazar-García et al., 2004; De Jager et al., 2006; Pérez-Maldonado et al., 2006; Trejo-

Acevedo et al., 2009; Pérez-Maldonado et al., 2010; Pérez-Maldonado et al., 2013; Martínez-Salinas 2012; Torres-Dosal et al., 2012; Trejo-Acevedo et al., 2012; Pérez-Maldonado et al., 2013; Trejo-Acevedo et al., 2013), asimismo, se han realizado diversos estudios ambientales donde se demuestra que aún hay niveles de COPs en el ambiente (Alegría, 2006; Miller-Pérez et al., 2009; Mejía-Saavedra et al., 2010; Martínez-Salinas, 2011).

Los resultados encontrados en el presente trabajo dentro del grupo de los DDTs indican que hay una tendencia a observar menores niveles de DDT en sangre que los niveles de DDE. De acuerdo a los resultados obtenidos es importante mencionar que el DDT rociado es transformado por el metabolismo humano y la biota o por degradación ambiental, principalmente al metabolito DDE (ATSDR, 2008).

Por lo tanto, los voluntarios analizados son susceptibles a presentar mayores niveles de DDE para los cuatro grupos de estudio, encontrando para Chetumal las concentraciones más altas, de acuerdo a otros estudios realizados anteriormente los niveles de DDE son mayores debido a que es el principal metabolito en sangre periférica del DDT (Pérez-Maldonado et al., 2006).

Los resultados obtenidos en el presente estudio para DDT del total de la población, son mayores y estadísticamente significativos comparados con los niveles de DDT para la población México-Americanos presentados en el IV reporte del NHANES (CDC, 2013). De igual manera para los niveles para DDE ( $4.9674 \pm 1.4306$  ng/g), presentan una diferencia significativa y son mayores a las concentraciones presentadas por el IV reporte del NHANES para población Hispana ( $2.69 \pm 0.06$  ng/g), (CDC, 2013).

Es importante señalar que en las comunidades analizadas se encontraron niveles de DDT y DDE menores a los niveles de otros estudios donde presentan niveles de 22,284

ng/g de lípido para DDE y 613 ng/g de lípido para DDT en niños de Chiapas; 10,767 de lípido de DDE y 2851 ng/g de lípido de DDT en niños de Quintana Roo (Trejo-Acevedo et al., 2009; Trejo-Acevedo et al., 2013). Sin embargo, los niveles encontrados en el presente estudio  $2.5594 \pm 0.7516$  ng/ml de DDTs, son mayores a los niveles de DDTs en sangre reportados en un estudio realizado por Pérez-Maldonado et al. (2010), para los países de Guatemala, Nicaragua, Honduras ( $< 0.3$ , 2.3 y 1.8 ng/ml respectivamente), probablemente debido a que en México el DDT se utilizó en mayor cantidad para el control de vectores de paludismo (Díaz-Barriga et al., 2003).

Es trascendente mencionar que el porcentaje de muestras positivas para DDT cuantificados en el presente estudio fue mayor a los reportados por Trejo-Acevedo et al. (2009), 14.41 % de las muestras fueron positivas para presentar niveles de DDT en sangre de una  $n$  de 229, en los análisis realizados en el presente trabajo se encontró que el 32.20 % de las muestras analizadas fueron positivas para niveles de DDT en sangre de una  $n$  de 58, por lo que se considera que los voluntarios analizados en el presente estudio aún pueden tener exposición a DDT o DDE (principal metabolito del DDT) residual de suelo o polvo (Martínez-Salinas et al., 2011; Torres-Dosal et al., 2012).

#### **7.2.2.1 Coeficiente DDT/DDE en sangre**

En la presente investigación se encontró una proporción de 0.1958 para Cárdenas como valor máximo encontrado y 0.0129 como valor mínimo encontrado para la comunidad de Control como se presentó en el cuadro 9 anteriormente. En general la proporción DDT/DDE fue menor a 1.0 para los valores encontrados en todas las comunidades analizadas. En una investigación previa, Torres-Dosal et al. (2012) reportó el coeficiente de DDT/DDE de 0.12, 0.13 y 0.16 para muestras de sangre en las



comunidades de Centla, Teapa y Nacajuca respectivamente, el valor de 0.1958 en sangre encontrado en esta investigación (cuadro 9) para la comunidad de Cárdenas es mayor a los reportados para las tres comunidades anteriormente mencionadas del estado de Tabasco. Como se mencionó anteriormente una proporción DDT/DDE cercana o superior a 1.0 indica que los voluntarios pudieron tener una exposición reciente a DDT contrario a esto la proporción DDT/DDE es menor a 1.0 indica que los voluntarios pudieron tener una exposición antigua a DDT por lo que su principal metabolito se encuentra en mayor proporción o bien posiblemente una exposición reciente a DDE (Tavares et al., 1999). Por lo que los resultados obtenidos en la presente investigación han sugerido que posiblemente el DDT ya no se utiliza en el Sureste de México para el control de plagas en los campos de cultivo de la caña de azúcar (Díaz-Barriga et al., 2003; Pérez-Maldonado et al., 2011; Martínez-Salinas et al., 2011).

### **7.2.3 Niveles de PCBs en sangre**

En general los niveles de PCBs mostrados en el cuadro 6 y figura 8 del presente trabajo fueron mayores comparado con los niveles de PCBs ( $0.005 \pm 0.001$  ng/g) presentados en el IV reporte del NHANES (CDC, 2013) en población Hispana de 20 a 39 años, presentando una diferencia significativa y niveles 80 veces mayores.

En el presente trabajo, los congéneres PCB 28 y 101 fueron los PCBs en mayor presencia en el análisis realizado para el grupo de PCBs. Se reportan niveles significativos para los congéneres 28 y 101 en comparación los datos presentados por Trejo-Acevedo et al. (2009) debido a que no se detectaron niveles para estos compuestos, sin embargo, la presencia del PCB 28 es similar a los resultados mostrados por Trejo-Acevedo et al., (2012), donde este congénere de PCB prevalece

en la población con niveles mayores a  $419.5 \pm 219.8$  ng/g de lípido. En los resultados mostrados en el cuadro 6 para los  $\Sigma$ PCBs, la comunidad de Cárdenas, es la más expuesta a este compuesto en comparación con las comunidades con actividad agrícola de la caña de azúcar, donde Chetumal es la comunidad que presentó los niveles más bajos para este metabolito. Es importante mencionar que el PCB 28 pertenece al grupo de PCBs triclorados y puede ser un metabolito producto de la degradación de un congénere tetraclorado o pentaclorado (UNEP, 2013).

### **7.3 Factores sociodemográficos y su relación con el daño al ADN y los niveles de COPs**

Se analizaron los factores sociodemográficos, para determinar si hay alguna diferencia estadística significativa entre las diferentes categorías y la relación que presentaron con el daño al ADN y los niveles de COPs:

i) La variable de la residencia, presentó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), entre las concentraciones de  $\Sigma$ COPs de los voluntarios residentes en comunidades rurales y los voluntarios con residencia urbana, por lo que los voluntarios expuestos a escenarios con actividad agrícola de la caña de azúcar (rurales), pueden constituir un grupo susceptible a presentar niveles de  $\Sigma$ COPs mayores que los niveles de  $\Sigma$ COPs encontrados en población urbana, estos resultados son similares a los niveles de COPs reportados por Barraza-Villarreal et al. (2004) y Arrebola et al. (2011) quienes reportaron una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en los niveles de COPs para voluntarios que viven en comunidades rurales comparados con los niveles de COPs de voluntarios residentes en comunidades urbanas, debido a la exposición ocupacional y ambiental a COPs, por otro lado, un voluntario de una zona urbana puede estar expuesto a COPs a través de los alimentos que puede consumir con

niveles traza de COPs. En relación al daño al ADN para el factor de residencia los habitantes con residencia urbana se obtuvieron valores de OTM de  $0.83 \pm 0.13$  mientras que para los habitantes con residencia rural los valores de OTM fueron  $6.49 \pm 0.83$ , teniendo una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), permitiendo observar los voluntarios de comunidades rurales estaban expuestos continuamente a algún agente genotóxico al que los voluntarios de comunidades urbanas no lo están;

ii) La variable del sexo, no presentó una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), entre los niveles de  $\Sigma$ COPs analizadas en hombres y mujeres pertenecientes a las comunidades de estudio, estos resultados coinciden con los presentados por Porta et al. (2009 y 2010) y Gasul et al. (2013) donde los valores de COPs no presentan una diferencia estadística significativa entre hombres y mujeres ( $P > 0.05$ ), probablemente esto indica que la exposición a COPs en las poblaciones de estudio es generalizada de manera que cualquier voluntario que viva en las regiones de estudio puede presentar niveles de COPs en sangre. Además la valoración del daño al ADN indicó un comportamiento similar entre los grupos de estudio, se encontró que no hay una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), entre los hombres y las mujeres analizados dentro de cada grupo. Es importante mencionar que como menciona Moller et al. (2000), la edad es un factor que puede influir indirectamente en el nivel de daño al ADN basal (Singh et al., 1990);

iii) La variable de la edad presentó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) sobre los niveles de COPs para el grupo de edad de 35 a 46 años, probablemente debido a que la media de la población perteneció a este rango de edad, además de que los jornaleros de la caña de azúcar encontraban en el mismo rango de edad por lo que pueden tener niveles más altos de COPs en sangre. Estos resultados son similares a

los reportados por Porta et al. (2010) donde encontraron una diferencia estadística significativa en los niveles de COPs de un grupo de voluntarios con edad de 18 a 29 años en comparación con los niveles de COPS de grupos de edad mayor a 30 años. Los niveles de daño al ADN en los grupos analizados, se indican que hay una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), del grupo de voluntarios expuestos comparado con el grupo control, para los cuatro rangos de edad. El factor de la edad se puede considerar como factor que puede incrementar los niveles de fragmentación del ADN debido para la población de estudio que se desempeña como jornalero de la caña de azúcar y que se exponen a más compuestos genotóxicos se encuentra en este rango de edad.

iv) Los resultados del análisis de la ocupación desempeñada por los voluntarios expuestos a escenarios agrícolas de cultivo de caña de azúcar, indican que la ocupación de los jornaleros, hogar que viven en las comunidades de estudio presentan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), lo que sugiere que la exposición de los voluntarios a los COPs es generalizada para las regiones con actividad agrícola de la caña de azúcar y se ve incrementada o potencializada por la exposición ocupacional de jornaleros de la caña de azúcar (Díaz-Barriga et al., 2003);

v) Por consiguiente la actividad de aplicación de plaguicidas, es un factor sociodemográficos determinante y relacionado a los niveles de COPs en las comunidades rurales con actividad agrícola de la caña de azúcar. En relación al daño al ADN los resultados indican que para este factor se observó una diferencia estadística significativa entre los voluntarios expuestos, los dedicados a actividades del hogar y los estudiantes expuestos ( $P < 0.05$ ). Además, la relación del factor de la aplicación de

plaguicidas y el daño al ADN indica que la aplicación de plaguicidas en voluntarios expuestos funciona como un factor relacionado a la incidencia de daño al ADN;

vi) El consumo de tabaco presentados en la figura 14 no son considerados factores asociados a la exposición de COPs ya que no presentan una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ). Estos resultados son similares a los presentados por Barraza-Villarreal et al. (2004), donde encontraron que no hay una diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre los voluntarios que fuman y los voluntarios que no fuman. Al mismo tiempo en relación al daño al ADN los resultados de los dos grupos de voluntarios analizados indican que no hay una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre los voluntarios que consumían tabaco los voluntarios que no consumían tabaco de las comunidades de estudio. Por lo que este factor puede descartarse como un factor de incremento en la fragmentación del ADN. Este resultado coincide con los presentados por McCauley et al. (2008) en donde al comparar el daño al ADN observado en voluntarios fumadores y los voluntarios no fumadores obtuvieron un valor de  $P=0.68$ ;

vii) La variable del consumo de alcohol (figura 15), se no observó una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) para el grupo expuesto, debido a que los valores de OTM en voluntarios que no consumen alcohol fue muy similar al de los voluntarios que si consumen alcohol, este resultado revela que el consumo de alcohol es un factor que no favorece la fragmentación de la molécula de ADN, esta variable por sí sola no está asociada a generar la fragmentación total del ADN en los voluntarios de comunidades con actividad agrícola de la caña de azúcar. Este resultado coincide con los presentados por Frenzilli et al. (1997); y, McCauley et al. (2008) en donde al comparar el daño al ADN observado en voluntarios que consumen alcohol y los voluntarios que

no consumen alcohol obtuvieron un valor de  $P= 0.57$ . Los resultados obtenidos de la relación de los factores sociodemográficos, el daño al ADN y la exposición a COPs del presente trabajo son similares a los presentados por Herrera-Portugal et al. (2005); McCauley et al. (2008); Bhalli et al. (2009); Kisby et al. (2009).

#### **7.4 Relación del daño al ADN y los niveles de $\Sigma$ COPs (HCHs, DDTs, y PCBs)**

En el presente estudio se valoró la relación el daño al ADN en PBMC y los niveles de  $\Sigma$ COPs cuantificados en la población de estudio para identificar y determinar el grupo de COPs que generan daño al ADN en PBMC. En la figura 16 se muestra el coeficiente de determinación del daño al ADN (OTM) y la mezcla de  $\Sigma$ COPs ( $\Sigma$ DDTs,  $\Sigma$ HCHs y  $\Sigma$ PCBs), obteniendo que el 60.86 % del daño detectado en los voluntarios puede estar ocasionado por los niveles de COPs en sangre de los voluntarios con exposición en zonas rurales de la caña de azúcar del Sureste de México.

Los resultados presentados en este estudio coinciden con resultados mostrados por McKuley et al. (2008); Bhalli et al. (2009) y Kisby et al. (2009), donde analizan la correlación de daño al ADN y la exposición a una diversa gama de plaguicidas en voluntarios expuestos a escenarios con actividad agrícola.

##### **7.4.1 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ HCHs- $\Sigma$ PCBs y $\Sigma$ DDTs**

En la figura 17 se presentó la relación del daño al ADN y los niveles de  $\Sigma$ HCHs y  $\Sigma$ PCBs, así como la relación daño al ADN y la mezcla de  $\Sigma$ DDTs, el resultado indica que la mayor proporción de daño al ADN es influenciado a la mezcla de DDTs al presentar un  $r^2 = 0.6146$ , por el contrario a esto, hay daño al ADN influenciado por la mezcla de  $\Sigma$ HCHs y  $\Sigma$ PCBs muy bajo con un  $r^2 = 0.0101$ , este resultado indica que los niveles de  $\Sigma$ DDTs pueden tener la capacidad de inducir un incremento en los niveles de daño al ADN de células mononucleares de sangre periférica, sin embargo, los niveles

de  $\Sigma$ HCHs, y  $\Sigma$ PCBs encontrados en los grupos expuestos no representan un riesgo que derive en un efecto de daño al ADN en este grupo de voluntarios.

#### **7.4.2 Relación del Daño al ADN con los niveles de $\Sigma$ DDTs, DDT y DDE**

Una vez conocido que la mezcla de  $\Sigma$ DDTs presentó una relación positiva con una correlación estadística significativa ( $P < 0.001$ ), en relación al daño al ADN que produce en PBMC de voluntarios expuestos en escenarios agrícolas de la caña de azúcar, se analizó la relación de los compuestos de DDT, DDE y DDTs para conocer si había un efecto de potencialización al momento de inducir el daño al ADN, o conocer si el daño al ADN se presentaba como un efecto derivado de una exposición a los compuestos de DDT o DDE, teniendo como resultado el coeficiente de determinación entre DDT y el daño al ADN una  $r^2 = 0.1360$ , al mismo tiempo el coeficiente de determinación entre DDE  $r^2 = 0.5151$ , al determinar la relación de la mezcla de  $\Sigma$ DDTs (DDT y el DDE) con el daño al ADN se obtuvo un coeficiente de determinación de  $r^2 = 0.6146$ , como se muestra en la figura 18. Estos resultados coinciden con los reportados por Herrera-Portugal et al. (2005); y, Pérez-Maldonado et al. (2006; 2010), donde presentaron una correlación estadística significativa ( $P < 0.001$ ) para el daño al ADN y la exposición crónica a DDT y DDE en niños y mujeres residentes en el estado de Chiapas. Asimismo, Yáñez et al. (2004); Pérez-Maldonado et al. (2004, 2005); reportan una asociación de daño al ADN (apoptosis y estrés oxidativo) y exposición a diferentes concentraciones de DDE *in vitro* e *in vivo*.

Es importante mencionar que si bien los plaguicidas organoclorados no se siguen utilizando hay vías de exposición como el suelo y polvo dentro y fuera de los hogares que fueron rociados durante las campañas de salud pública (Martínez-Salinas et al., 2011; Torres-Dosal et al., 2012).

Un posible mecanismo implicado en el daño al ADN por exposición crónica a DDE es la inducción de formación de radicales libres de las especies reactivas de oxígeno generadas durante la biotransformación de los tóxicos (Klaunig y Kamendulis, 2008). En otros estudios *in vitro* donde estudiaron un grupo de ratas a una exposición crónica DDT, mencionan que hay diferentes mecanismos que están involucrados en la inducción de daño al ADN: las lesiones por daño oxidativo (Delaney et al., 1997; Rojas et al., 1999); la fragmentación de la doble hebra de ADN por peroxidación lipídica inducida por el lindano, DDT, clordano y endrina en ratas (Hassoun et al., 1993); y, peroxidación de lípidos en el hígado (Barros et al., 1994).

Es importante mencionar que las especies reactivas de oxígeno pueden ser mediadas por los mecanismos del ciclo redox en presencia del oxígeno molecular y por las oxidaciones de tóxicos catalizada por la peroxidasa (Klaunig y Kamendulis 2008), por lo que, si hay una disminución de antioxidantes como la vitamina C en la dieta de la población es posible que esta serie de daños oxidativos se vea aumentada debido a que no hay mecanismos eficaces de control y reparación del daño al ADN (Abuja y Albertini, 2001).

Cabe indicar, que los jornaleros de la caña de azúcar se exponen directamente a los rayos UV del sol durante la temporada de zafra (temporada en la que se realizó el muestreo) por lo que parte del daño analizado puede deberse a esta exposición ambiental ante un agente físico (Ayala et al., 2004).

Hay diferentes mecanismos propuestos para la inducción de daño genotóxico, Pérez-Maldonado et al. (2004), demostraron que el DDT y sus metabolitos pueden inducir apoptosis de PBMC, en estudios *in vitro* e *in vivo* donde encontraron un incremento en



el porcentaje apoptosis en niños expuestos crónicamente al DDT y sus metabolitos, comparados con niños no expuestos al DDT.

Por otro lado, Yáñez et al. (2004), analizaron la influencia en la inducción de daño al ADN en PBMC por exposición al DDT en estudios *in vitro* e *in vivo* en mujeres crónicamente expuestas encontrando una correlación positiva entre el daño al ADN y las concentraciones de DDT, DDE y DDD. En estudios *in vitro* de ratas expuestas a DDT se demostró que hay diferentes mecanismos que están involucrados en la inducción de daño al ADN: las lesiones por daño oxidativo (Delaney et al., 1997; Rojas et al., 1999); la fragmentación de la doble hebra de ADN por peroxidación lipídica inducida por el lindano, DDT, clordano y endrina en ratas (Hassoun et al., 1993); y, peroxidación de lípidos en el hígado (Barros et al., 1994).

Posteriormente, Pérez-Maldonado et al. (2005), encontraron una correlación entre la generación de ROS y apoptosis celular y estrés oxidativo en PBMC humanas *in vitro*, ante la exposición a compuestos de DDT, DDE y DDD, demostraron que la inducción de apoptosis por la exposición a DDT y sus metabolitos PBMC humanas procede del incremento en los niveles de ROS. Además, encontraron una mayor producción de ROS ante una exposición a DDE. Por otro lado se ha demostrado que los compuestos clorados como dieldrina, lindano, dioxinas, pueden aumentar las especies reactivas de oxígeno a través de mecanismos mediados por el P450 (Rice et al., 1994; Klaunig y Kamendulis, 2008).

Los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial han demostrado que para producir superóxido el DDE interactúa con la succinato deshidrogenasa, la disminución de la respiración y el potencial de membrana (Kudin et al., 2004). El carácter hidrófobo de DDE es más alta que la del DDT y DDD (ATSDR, 2008).

De igual forma la estructura química lipofílica de los COPs permite la entrada de estos a la célula a través de la membrana celular por difusión pasiva, que permite que los COPs lleguen al citosol (Miller-Pérez et al., 2009). Hay diversos efectos biológicos de los PCBs y las dioxinas que están mediados por la activación del receptor aril hidrocarburo (AhR por sus siglas en inglés), (Schmidt y Bradfield, 1996). Safe et al. (1985), propusieron el mecanismo de acción en el citosol de los PCBs, los cuales funcionan como ligandos del receptor AhR. El receptor AhR pertenece a la familia de los receptores esteroides y es un factor de transcripción activado por ligandos que controla la expresión de algunos genes específicos como los de los citocromos P450 CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 (Mckinney et al., 1985; Rowlands y Gustafsson, 1997; Gauger et al., 2007; Miller-Pérez et al., 2009). De esta manera, hay algunos cambios en la expresión de genes que conducen a alteraciones de los procesos celulares y sus funciones específicas, como el aumento de la actividad del citocromo P-450, mismo oxida compuestos tóxicos en el organismo, pero que para compuestos específicos como el DDT provoca la generación de metabolitos tóxicos (DDE) durante el proceso de eliminación de contaminantes en el organismo (Denison y Nagy, 2003).

## Capítulo 8. Conclusiones

De acuerdo con la valoración realizada en el presente trabajo sobre el daño al ADN y el análisis de los niveles de COPs en la población de voluntarios expuestos ambientalmente en escenarios con actividad agrícola de la caña de azúcar se presentan las siguientes conclusiones:

1. Hay niveles de COPs (DDE y DDT, HCHs) en suero sanguíneo de los voluntarios de estudio por lo que se presume que hay una exposición a una mezcla de COPs generalizada en la población distribuida en escenarios con actividad agrícola de la caña de azúcar en el Sureste de México.
2. La comunidad de Chetumal presentó los mayores niveles de DDTs y de la mezcla de  $\Sigma$ COPs en relación a los niveles de  $\Sigma$ COPs encontrados en sangre periférica de voluntarios de las comunidades de Huixtla y Cárdenas y la comunidad Control.
3. La mezcla de  $\Sigma$ DDTs fue la que más prevaleció en los grupos analizados. Donde el DDE predominó como el metabolito presente en mayor proporción para todas las comunidades.
4. El coeficiente de DDT/DDE demostró que la exposición a estos compuestos puede ocasionarse de un periodo mayor a 5 años, por lo que se asume que la exposición a los COPs es crónica a compuestos residuales probablemente en el suelo o polvo dentro y fuera de los hogares e incluso a los alimentos ingeridos.
5. Hay daño al ADN en PBMC asociado a los niveles de DDE, en este trabajo se demostró que este compuesto induce el daño al ADN de PBMC, además es importante mencionar que en las comunidades de estudio, el daño al ADN encontrado fue mayor para la comunidad de Chetumal.

6. Los niveles de HCHs de los voluntarios de estudio no tienen la capacidad para inducir daño al ADN de PBMC de manera significativa.
7. Las comunidades de estudio presentan niveles de  $\Sigma$ PCBs bajos, en la mayoría de los voluntarios de estudio hay niveles debajo de los límites de detección del método cromatográfico, estos niveles tienen la capacidad de desencadenar un efecto sobre el daño al ADN de PBMC.
8. Los factores del sexo, los hábitos de consumo de tabaco y alcohol, no están relacionados directamente a incrementar niveles de COPs y daño al ADN en los voluntarios que viven en escenarios con actividad agrícola de la caña de azúcar.
9. Se encontró que el tipo de residencia rural, el grupo de edad de 36-45 años, la ocupación de jornalero en voluntarios dedicados a actividades del hogar y los voluntarios que aplican plaguicidas se comportaron como factores de riesgo relacionados con el aumento de los niveles de COPs y a su vez el aumento de los niveles de daño en la molécula de ADN de PBMC de los voluntarios de las comunidades de estudio.

## **Capítulo 9. Perspectivas de investigación**

El presente estudio muestra un biomonitoreo de la exposición ambiental en regiones agrícolas del cultivo de la caña de azúcar, si bien la exposición encontrada y el efecto de daño al ADN en células mononucleares de sangre periférica en humanos es un acercamiento a los posibles efectos relacionados a la exposición a los COPs. Es importante realizar un biomonitoreo donde se analicen otros posibles efectos derivados de una exposición crónica a COPs como la Diabetes, ya que en estudios recientes realizados en Estados Unidos de América y Japón reportan una posible relación entre los niveles de COPs encontrados en humanos y la incidencia en presentar enfermedades crónico degenerativas como la diabetes (Nelson et al., 2010; Nishiumi et al., 2010; Taylor et al., 2013). Cabe mencionar que la Diabetes es un grave problema en salud pública a nivel mundial (WHO, 2011).

## Capítulo 10. Literatura Citada

- Abuja, P.M., Albertini, R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation, and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 306: 1–17.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Riesgo de Enfermedades. 1995. Mirex y clordecona. *Resumen de Salud Pública*.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Riesgo de Enfermedades. 2005. Hexaclorociclohexano. *Resumen de Salud Pública*.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008. Addendum to the DDT/DDD/DDE Toxicological Profile.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2012. Addendum to the Mirex and Chlordecone.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2002. Toxicological profile for Aldrin/Dieldrin.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2002. Toxicological profile for Hexachlorobenzene.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2010. Draft toxicological profile for Toxaphene.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2011. Addendum to the toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls.
- Alegría, H., Bidleman, T., Shaw, T.J. 2000. Organochlorine Pesticides in Ambient Air of Belize, Central America. *Environ Sci Technol*. 34: 1953-1958.
- Alegría, H., Bidleman, T.F., Figueroa, M. 2006. Organochlorine pesticides in the ambient air of Chiapas, Mexico. *Environmental Pollution*. 140: 483-491.
- Alegria, H. A., Wong, F., Jantunen, L. M., Bidleman, T. F., Figueroa, M. S., Bouchot, G. G. Infanzon, R. 2008. Organochlorine pesticides and PCBs in air of southern México (2002-2004). *Atmospheric environment*. 42(38), 8810-8818.
- Alegría-Torres, J.A., Díaz-Barriga, F., Gandolfi, A.J., Pérez-Maldonado, I.N. 2009. Mechanisms of p,p-DDE-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology In Vitro*. 23: 1000–1006.

- Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., del Carmen Juárez-Vázquez, M., Chávez, M., Ortiz-Andrade, R. 2012. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of ethnopharmacology*. 141(3), 888-894.
- Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., González-Chávez, M. M., Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D. M., Hernández-Morales, A. 2016. Pharmacological effects and toxicity of *Costus pulverulentus* C. Presl (Costaceae). *Journal of ethnopharmacology*. 180, 124-130.
- Aneck, N.H., Schulenburg, G.W., Bornman, M.S., Farias, P., De Jager, C. 2007. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *J Androl*. 28 (3): 423-434.
- Arencibia, D. F., Rosario, L. A. 2010. Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa *in vivo* en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *Retel*. 26(1), 1-12.
- Arrebola, J.P., Mutch, E., Rivero, M., Choque, A., Silvestre, S., Olea N., Ocaña, R., Mercado, L.A. 2011. Contribution of sociodemographic characteristics, occupation, diet and lifestyle to DDT and DDE concentrations in serum and adipose tissue from a Bolivian cohort. *Environment International*. 38: 54–61.
- Arrona-Rivera, A. E., Enríquez, P. L., García-Feria, L. M., Orellana, S. A., & von Osten, J. R. 2016. Organochlorine Pesticides in the Ferruginous Pygmy Owl (*Glaucidium brasilianum*) in Chiapas, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, .97 (3), 337-345.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. 2005. Opinion of the Scientific Panel in Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission related to Gamma-HCH and other Hexachlorocyclohexanes as undesirable Substances in Animal Feed. The EFSA Journal 250, pp. 1 a 39.
- Ayala, M.C., Hernández, Y., Piñeiro, J., González, E. 2004. Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. *Acta Farm. Bonaerense*. 23 (3): 277-284.

- Azqueta, A., Gutzkowb, K.B., Brunborgb, G., Collins, A.R. 2011. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research*. 724: 41– 45.
- Badawi, A.F., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G. 2000. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 and 2-and 4-hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21: 1593-1599.
- Barber, D.A., Harris, S.R. 1994. Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *Am Pharm*. NS34:26–35.
- Barraza-Villarreal, A., Farías, P., Díaz-Sánchez, V., Bailey, J., De Jager, T., Ayotte, P., Hernández-Ávila, M., Dewailly, E., Chul-Chuq. 2004. Nonoccupational Determinants of Plasma DDT and p,p'-DDE in Men from Chiapas, Mexico. *Archives Of Environmental Health*. 59 (1): 42-49.
- Barros, S.B.M., Pimente, R., Simizu, K., Azzalis, L.A., Costa, I.S., Junqueira, V.B.C. 1994. Dose-dependent study of liver lipid peroxidation-related parameters in rats treated with p,p'-DDT. *Toxicol Lett*. 70: 33–38.
- Battershill, J.M., Burnett, K., Bull, S. 2008. Factors affecting the incidence of biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis*. 23 (6): 423–437.
- Baumgartner, A., Cemeli, E., Anderson, D. 2009. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol*. 25: 81–98.
- Belles, M., Bilrha, H., Moreau, B. 2000. Immunological effects in newborns from Saint-Lawrence River Coastal populations exposed to POPs and heavy metals. *Organohalogen Compounds*. 48: 227-230.
- Beth, M., Delgado, L., Vin, N., Chen, N., Santella, R. 2011. DNA methylation in white blood cells: Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics*. 6 (7): 828-837.
- Betteridge, D.J. 2000. What is oxidative stress?. *Metabolism*. 49: 3–8
- Bhalli, J.A., Ali,T., Asi, M.R., Khalid, Z.M., Ceppi, M., Khan, Q.M. 2009. DNA Damage in Pakistani Agricultural Workers Exposed to Mixture of Pesticides. *Environ Mol Mutag*. 50: 37-45.



- Bjorge, C., Brunborg, G., Wiger, R. 1996. A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated human and rat testicular cells. *Reprod Toxicol.* 10 (6): 509-519.
- Breivik, K., Armitage, J. M., Wania, F., Sweetman, A. J., Jones, K. C. 2016. Tracking the global distribution of Persistent Organic Pollutants accounting for e-waste exports to developing regions. *Environ. Sci. Technol.* 50, 798–805
- Caliani, I., Campani, T., Giannetti, M., Marsili, L., Casini, S., & Fossi, M. C. 2014. First application of comet assay in blood cells of Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Marine environmental research.* 96, 68-72.
- Castro-Castro, V., Siu-Rodas, Y., González-Huerta, L. V., Sokolov, M. Y. 2005. Toxic effect of DDT and endosulfan in white shrimp postlarvae *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) from Chiapas, Mexico. *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 53(1-2), 141-151.
- Cárdenas-González, M., Gaspar-Ramírez, O., Pérez-Vázquez, F.J., Alegría-Torres, J.A. González-Amaro, R., Pérez-Maldonado, I.N. 2013. p,p'-DDE, a DDT metabolite, induces proinflammatory molecules in human peripheral blood mononuclear cells "in vitro". *Experimental and Toxicologic Pathology.* 65: 661–665.
- Carrera, G., Fernández, P., Vilanova, R. M., Grimalt, J. O. 2001. Persistent organic pollutants in snow from European high mountain areas. *Atmospheric environment*, 35(2), 245-254.
- Charruau, P., Hénaut, Y., Alvarez-Legorreta, T. 2013. Organochlorine pesticides in nest substratum and infertile eggs of American crocodiles (*Reptilia, Crocodylidae*) in a Mexican Caribbean atoll. *Caribbean Journal of Science.* 47(1), 1-12.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Environmental Health. Division of Laboratory Sciences. Atlanta, Georgia.

- Centers for Disease Control and Prevention 2013. National Health and Nutrition Examination Survey. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Consultado el 20 de noviembre de 2013 en: [http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport\\_UpdatedTables\\_Sep2013.pdf](http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Sep2013.pdf)
- Commission for Environmental Cooperation. 2003. América del Norte ya no usa DDT. Consultado el 15 de marzo de 2016 en: <http://www.cec.org/islandora/es/item/1968-ddt-no-longer-used-in-north-america-es.pdf>
- Commission for Environmental Cooperation. 2006. The North American Regional Action Plan (NARAP) on Lindane and Other Hexachlorocyclohexane (HCH) Isomers. 2006. Consultado el 20 de octubre de 2013 en: [http://www.cec.org/Storage/36/2797\\_NARAP\\_on\\_Lindane\\_and\\_Other\\_Hexachlorocyclohexane\\_Isomers.pdf](http://www.cec.org/Storage/36/2797_NARAP_on_Lindane_and_Other_Hexachlorocyclohexane_Isomers.pdf)
- Collins, A.R. 2004. The Comet Assay for AND Damage and Repair. *Principles. Mol Biotech.* 26: 249-261.
- Dai, D., Cao, Y., Falls, G. 2001. Modulation of mouse P450 isoforms CYP1A2, CYP2B10, CYP2E1, and CYP3A by the environmental chemicals mirex, 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene, vinclozolin, and flutamide. *Pestic Biochem Physiol.* 70(3): 127-141.
- Daniel, V., Huber, W., Bauer, K. 2001. Associations of blood levels of PCB, HCHs, and HCB with numbers of lymphocyte subpopulations, in vitro lymphocyte response, plasma cytokine levels, and immunoglobulin autoantibodies. *Environ Health Perspect.* 109(2): 173-178.
- De Jager, C., Farias, P., Barraza, A., Avila, M.H., Ayotte, P., Dewailly, E., Dombrowski, C., Rousseau, F., Sanchez, V.D., Bailey, J.L. 2006. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study. *J Androl.* 27: 16-27.
- De Roos, A.M., Hartge, P., Lubin, J.H. 2005. Persistent organochlorine chemicals in plasma and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 65 (23): 11214-226.

- Denison, M.S., Nagy, S.R. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43: 309-334.
- Dehn, P. F., Allen-Mocherie, S., Karek, J., Thenappan, A. 2005. Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels. *Toxicology in vitro.* 19(2), 261-273.
- Delaney, C.A., Green, I.C., Lowe, J.E., Cunningham, J.M., Butler, A.R., Renton, L., Costa, I.D., Green, M.H. 1997. Use of the comet assay to investigate possible interactions of nitric oxide and reactive oxygen species in the induction of DNA damage and inhibition of function in an insulin-secreting cell line. *Mutat Res.* 375: 137–146.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol and Toxicol.* 25: 5-32.
- Díaz-Barriga, F., Borja, A., Waliszewski, S., Yáñez, L. 2003. DDT in Mexico. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part O. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: pp 271-388.
- Díaz-Barriga, F., López, D., Pérez, I., Beatres, L., Yáñez, L. 2004. Evaluación del Riesgo para las Sustancias Tóxicas Persistentes, Capítulo. 7. Fernández, A., Yarto, M., Castro, J. Las Sustancias Tóxicas Persistentes.
- Dusinska, M., Collins, A.R., 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis.* 23: 191–205.
- Espinosa, G., Ilizaliturri, C., González, D., Costilla, R., Díaz, F., Cuevas, M., Martínez, M., Mejía, J. 2010. DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *J. of Environ. Science and Health.* 45: 49-55.
- Espinosa, G., Ilizaliturri, C.A, González D., Pelallo, N., Torres, A., Mejía, J., Costilla, R., Trejo, A., Pérez, I., Díaz, F. 2007. “Monitoreo ambiental, determinantes de la exposición y efectos de contaminantes críticos en humanos y biota en Coatzacoalcos, Veracruz”. INE/A1-047/2007.
- Ersson, C., Möller, L. 2011. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions

- and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis*. 26: 689–695.
- Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*. 566: 209–229.
  - Franken, C., Koppen, G., Lambrechts, N., Govarts, E., Bruckers, L., Den Hond, E., Baeyens, W. 2016. Environmental exposure to human carcinogens in teenagers and the association with DNA damage. *Environmental Research*, 152, 165-174.
  - Frenzilli, G., Betti, C., Davini, T., Desideri, M., Fornai, E., Giannessi, L., Maggiorelli, F., Paoletti, P., and Barale, R. 1997. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res*. 375: 117–123.
  - Fu, J., Mai, B., Sheng, G., Zhang, G., Wang, X., Peng, P. A., Wang, Z. 2003. Persistent organic pollutants in environment of the Pearl River Delta, China: an overview. *Chemosphere*. 52 (9), 1411-1422.
  - Garte, S., Bonassi, S. 2005. Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-Special issue overview. *Mutat Res*. 592: 3-5.
  - Gasull, M., Pumarega, J., Rovira, G., López, T., Alguacil, J., Porta, M. 2013. Relative effects of educational level and occupational social class on body concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the general population of Catalonia, Spain. *Environment International*. 60: 190–201.
  - Gauger, K.J, Giera, S., Sharlin, D.S., Bansal, R., Iannacone, E. 2007. Polychlorinated biphenyls 105 and 118 form thyroid hormone receptor agonists after cytochrome P4501A1 activation in rat pituitary GH3 cells. *Environ Health Perspect*. 115: 1623-1630.
  - Gerić, M., Ceraj-Cerić, N., Gajski, G., Vasilić, Ž., Capuder, Ž., 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.

- González-Mille, D., Ilizaliturri-Hernández, C., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., Mejía-Saavedra, J. 2010. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*. 19(7): 1238-1248.
- Green, M.H., Lowe, J.E., Delaney, C.A., Green, I.C. 1996. Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol*. 269: 243-266.
- Grindel, A., Guggenberger, B., Eichberger, L., Pöppelmeyer, C., Gschaider, M., Tosevska, A., & Wagner, K. H. 2016. Oxidative stress, DNA damage and DNA repair in female patients with diabetes mellitus type 2. *PLoS one*. 11(9), e0162082.
- Gupta, R., Ravooria, S., Ayotteb, P., Srinivasanc, C., Pereg, D., Robertsond, L., Russella, G., Jeyabalana, J. 2008. DNA damage associated with PCBs in the whole blood cells of Inuit. *Environ Toxicol. and Pharmacology*. 25 (2): 273-276.
- Gutiérrez, R., Ruíz, J. L., Ortiz, R., Vega, S., Schettino, B., Yamazaki, A., de Lourdes Ramírez, M. 2012. Organochlorine pesticide residues in bovine milk from organic farms in Chiapas, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(4), 882-887.
- Hardell, L., Andersson, S., Carlberg, M. 2006. Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and the risk of prostate cancer. *J Occup Environ Med*. 48 (7): 700-07.
- Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F., Suter, W. 2003. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat Res*. 536: 27-38.
- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L. 2004. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*. 19: 51-59.
- Hasan, M., Todoriki, S., Miyanoshita, A., & Imamura, T. 2012. Age- and time interval-specific gamma radiation-induced DNA damage in adult maize weevils,

- Sitophilus zeamais Motschulsky, assessed using comet assays, *Mutation Research/Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*. 741 (1): 95-100.
- Hassoun, E., Bagchi, M., Bagchi, D., Stohs, S.J. 1993. Comparative studies on lipid peroxidation and DNA-single strand breaks induced by lindane, DDT, chlordane and endrin in rats. *Comput Biochem Physiol*. 104 (C): 427–431.
  - Herrera-Portugal, C., Ochoa, H., Franco, G., Díaz, F. 2005. DNA Damage in Children Exposed to DDT in a Malarious Area of Chiapas, México. *Acta Toxicol Argent*. 13 (1): 12-16.
  - Hodgson, S., Thomas, L., Fattore, E. 2008. Bone mineral density changes in relation to environmental PCB exposure. *Environ Health Perspect*. 116 (9): 1162–1166.
  - Hoffman, H., Hogel, J., Speit, G. 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*. 20: 455–466.
  - Houde, M., Muir, D. C., Kidd, K. A., Guildford, S., Drouillard, K., Evans, M. S., Kling, H. 2008. Influence of lake characteristics on the biomagnification of persistent organic pollutants in lake trout food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(10), 2169-2178.
  - Ibarra, E., Cerda, R., Dávila, M., Samayo, A., Calzado, C., Cortés, E. 2010. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 47: 111-116.
  - Instituto Nacional de Ecología. 2011. Lista de Plaguicidas Prohibidos y Restringidos en México. Consultado 05 de octubre de 2011: <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas>
  - Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2013a. EL Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus implicaciones para México. Consultado el 05 de septiembre de 2013, en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/gacetas/422/convenio.html>
  - Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2013b. Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) Consultado el diez de octubre de 2013, en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/765-sqre-cop>

- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2013c. Características Físico-químicas de los Plaguicidas y su transporte en el ambiente. Consultado el 12 de noviembre de 2013, en: [http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/descargas/caracteristicas\\_fyg\\_plaguicidas.pdf](http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/descargas/caracteristicas_fyg_plaguicidas.pdf)
- Ishikawa, H., Miyatsu, Y., Kurihara, K., Yokoyama, K. 2006. Gene environmental interactions between alcohol-drinking behavior and ALDH2 and CYP2E1 polymorphisms and their impact on micronuclei frequency in human lymphocytes. *Mutat Res.* 594: 1–9.
- Jasso-Pineda, Y., Díaz-Barriga, F., Yáñez-Estrada, L., Pérez-Vázquez, F. J., & Pérez-Maldonado, I. N. 2015. DNA damage in Mexican children living in high-risk contaminated scenarios. *Science of the Total Environment.* 518, 38-48.
- Juárez-Santacruz, L., García-Nieto, E., García-Gallegos, E., Romo-Gómez, C., Ortiz-Ortiz, E., Costilla-Salazar, R., & Luna-Zendejas, H. S. 2015. DNA Damage in Vicia faba by Exposure to Agricultural Soils from Tlaxcala, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* 95(6), 764-769.
- Kalantzi, O.I., Hewitt, R., Ford, K.J. 2004. Low dose induction of micronuclei by lindane. *Carcinogenesis.* 25 (4): 613-622.
- Kamendulis, L., Kojala, K., Stevenson, D. 2001. Comparative effects of aldrina on hepatic ploidy, cell proliferation, and apoptosis in rodent liver. *J. Toxicol Environ Health.* 62: 127-141.
- Khisroon, M., Khan, A., Naseem, M., Ali, N., Khan, S., Rasheed, S. B. 2015. Evaluation of DNA damage in lymphocytes of radiology personnel by comet assay. *Journal of occupational health.* (0).
- Kim, K., Dong, K., Sung, L., In, L., Jung, K., Yoon, C., David R.J., Michael, S., Duk, L. 2010. Association of Low-Dose Exposure to Persistent Organic Pollutants with Global DNA Hypomethylation in Healthy Koreans. *Environ Health Perspect.* 118 (3): 370-374.
- Kisby, G., Muniz, J.F., Scherer, J., Lasarev, M.R., Koshy, M., Kow, Y.W., McCauley, L. 2009. Oxidative Stress and DNA Damage in Agricultural Workers. *J. of Agromedicine.* 14 (2): 206-214.



- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2008. Chemical Carcinogenesis. En: Klaassen, C. D. *Toxicology Casarett and Doull's. The Basic science of Poisons*. Mcgraw-Hill. 7<sup>th</sup> edition. pp 553-554.
- Klaassen, C.D. 2013. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. Vol. 1236. McGraw-Hill. 8<sup>th</sup> edition pp 951
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., Kunz, W.S. 2004. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal Of Biological Chemistry*. 279 (6): 4127–4135.
- Lee, R. F., Bulski, K., Adams, J. D., Peden-Adams, M., Bossart, G. D., King, L., & Fair, P. A. 2013. DNA strand breaks (comet assay) in blood lymphocytes from wild bottlenose dolphins. *Marine pollution bulletin*. 77(1), 355-360.
- Ley General de Salud, de la Secretaría de Salud y la Investigación para la Salud. Consultado el 31 de octubre de 2011, en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
- Liu, L., Bridges, R.J., Eyer, C.L. 2001. Effect of cytochrome P450 1A induction on oxidative damage in rat brain. *Mol Cell Biochem*. 223: 89–94.
- Liman, R., Ciğerci, İ. H., Akyıl, D., Eren, Y., Konuk, M. 2011. Determination of genotoxicity of fenaminosulf by Allium and Comet tests. *Pesticide biochemistry and physiology*. 99(1), 61-64.
- López, M., Nigro, M., Portmann, E., Angeleri, G., Gurni, A., Carballo, M. 2009. Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8 (2): 154-159.
- Martínez, C., Gómez, S. 2007. Riesgo Genotóxico por Exposición a Plaguicidas en Trabajadores Agrícolas. *Rev Int Contam Ambient*. 23 (4): 185-200.
- Martínez, J.M., Afshari, C.A., Bushel, P.R., Masuda, A., Takahashi, T. 2002. Differential toxicogenomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells. *Toxicol Sci*. 69: 409–423.
- Martínez, M.A., Ramos, M.J. 2010. ¿Porqué hablar de compuestos orgánicos persistentes?. *Ecofronteras*. 39: 6-8.



- Martínez-Salinas, R.I., Díaz-Barriga, F., Batres-Esquivel, L.E., Pérez-Maldonado, I.N. 2011. Assessment of the levels of DDT and its metabolites in soil and dust samples from Chiapas, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86: 33–37.
- Martínez-Salinas, R.I., Pérez-Maldonado, I.N., Batres-Esquivel, L.E., Flores-Ramírez, R. Díaz-Barriga, F. 2012. Assessment of DDT, DDE, and 1-hydroxypyrene levels in blood and urine samples in children from Chiapas Mexico. *Environ Sci Pollut Res.* 19: 2658–2666.
- Mathur, V., Bhatnagar, P., Sharma, R.G. 2002. Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from Jaipur. *Environ Int.* 28 (5): 331-336.
- Mazzeo, D. E. C., Matsumoto, S. T., Levy, C. E., de Angelis, D. D. F., Marin-Morales, M. A. 2013. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. *Chemosphere.* 90(3), 1030-1036.
- McCauley, L., Lasarev, M., Muniz, J., Stewart, V., Kisby, G. 2008. Analysis of Pesticide Exposure and DNA Damage in Immigrant Farmworkers, *J. of Agromedicine.* 13 (4): 237-246.
- McKinney, J.D., Chae, K., McConnelit, E.E., Birnbaumt, L.S. 1985. Structure-induction versus structure-toxicity relationships for polychlorinated biphenyls and related aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives.* 60: 57-68.
- Mejía-Saavedra, J., González-Mille, D., Ilizaliturri-Hernández, C., Espinosa-Reyes, G., Martínez, M., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F. 2010. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and genotoxic effects in fish and giant toads of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Toxicology Letters.* 196, pp. S59-S60.
- Miller-Pérez, C., Sánchez-Islas, E., Mucio-Ramírez, S., Mendoza-Sotelo, J., León-Olea, M. 2009. Los contaminantes ambientales bifenilos policlorinados (PCB) y sus efectos sobre el Sistema Nervioso y la salud. (Spanish). *Salud Mental.* 32 (4): 335-346.
- Mills, P. K., Yang, R., Riordan, D. (2005). Lymphohematopoietic cancers in the United Farm Workers of America (UFW), 1988–2001. *Cancer Causes & Control.* 16(7), 823-830.

- Moller, P., L. E. Knudsen, S. Loft & H. Wallin. 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 1005–1015.
- Moller, P. 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96: 1–42.
- Moller, P. 2006. The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 98 (4): 336–345.
- Müller, W., Ciborovius, J., Bauch, T., Johannes, C., Schunck, C., Mallek, U., Böcker, W., Obe, G., Streffer, C. 2004. Analysis of the action of the restriction endonuclease Alul using three different comet assay protocols. *Strahlenther Onkol.* 180: 655–664.
- Müller, W.U. 2007. Comet assay. *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health.* pp 161-176.
- Murga, M. N., Gutiérrez, R., Vega, S., Pérez, J. J., Ortiz, R., Schettino, B., Ruíz, J. L. 2016. Organochlorine pesticide distribution in an organic production system for cow's milk in Chiapas, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part B,* 1-5.
- Nelson J, Hatch E, Webster T. 2010. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and cholesterol, body weight, and insulin resistance in the general U.S. population. *Environ Health Perspect.* 118: 197–202.
- Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T, Yoshida K, Ashida H. 2010. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs an insulin signaling pathway through the induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in adipocytes. *Toxicol Sci.* 115 (2): 482–491.
- North American Regional Action Plan (NARAP) on Lindane and Other Hexachlorocyclohexane (HCH) Isomers. 2006. Commission for Environmental Cooperation. Consultado el 01 de noviembre de 2015, en: <http://www3.cec.org/islandora/en/item/11602-north-american-regional-action-plan-narap-lindane-and-other-en.pdf>
- Olive, P.L. 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 75: 395–405.

- Olive, P.L. 2009. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutation Research*. 681: 13–23.
- Ouyang, F., Perry, M.J., Venners, S.A., Chen, C., Wang, B., Yang, F., Fang, Z., Zang, T., Wang, L., Xu, X., Wang, X. 2005. Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. *Occup Environ Med*. 62 (12): 878-884.
- Paiva, J., Cabral, I., Soares, B., Sombra, C., Ferreira, J., Moraes, M., Cavalcanti, M., Pessoa, C. 2011. Biomonitoring of Rural Workers Exposed to a Complex Mixture of Pesticides in the Municipalities of Tiangúá and Ubajara (Ceará State, Brazil): Genotoxic and Cytogenetic Studies. *Environ. Mol. Mutagen*. 52: 492-501.
- Parliament Of Canada. 2015. Pesticides in the environment. Consultado el 01 de noviembre de 2015, en: <http://www.parl.gc.ca/HousePublications/Publication.aspx?DocId=1031697&Language=E&Mode=1&Parl=36&Ses=2&File=514>
- Parmar, D., Yadav, S., Dayal, M. 2003. Effect of lindane on hepatic and brain cytochrome P450s and influence of P450 modulation in lindane induced neurotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 41: 1077-1087.
- Park, H.Y., Hertz-Picciotto, I., Petrik, J. 2008. Prenatal PCB exposure and thymus size at birth in neonates in Eastern Slovakia. *Environ Health Perspect*. 116: 104–109.
- Pérez-Maldonado, I.N., Díaz-Barriga, F., De la Fuente, H., González-Amaro, R., Calderón, J., Yáñez, L., 2004. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells *in vitro* and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ. Res*. 94: 38–46.
- Pérez-Maldonado, I.N., Herrera, C., Batres, L.E., González-Amaro, R., Díaz-Barriga, F., Yáñez, L. 2005. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environmental Research*. 98: 177–184.
- Pérez-Maldonado, I.N., Athanasiadou, M., Yáñez, L., González, R., Bergman, A., Díaz, F. 2006. DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite. *Science of the Total Environment*. 370: 343–351.
- Pérez-Maldonado, I. N., Trejo, A., Ruepert, C., Jovel, R. D. C., Méndez, M. P., Ferrari, M., Saballos, E., Alexander, C., Yáñez-Estrada, L., López, D., Henao, S.,

- Pinto, E., Díaz-Barriga, F. 2010. Assessment of DDT levels in selected environmental media and biological samples from Mexico and Central America. *Chemosphere*. 78(10): 1244-1249.
- Pérez-Maldonado, I. N., Pérez-Vázquez, F. J., Gaspar-Ramírez, O., González-Amaro, R., Díaz-Barriga, F. 2011. Variability in DDT-induced apoptosis in Mexican indigenous populations. *Toxicology mechanisms and methods*. 21(9), 675-680.
  - Pérez-Maldonado, I.N., Trejo-Acevedo, A., Pruneda-Alvarez, L.G., Gaspar-Ramirez, O., Ruvalcaba-Aranda, S., Perez-Vazquez, F.J. 2013. DDT, DDE, and 1-hydroxypyrene levels in children (in blood and urine samples) from Chiapas and Oaxaca, Mexico. *Environ Monit Assess*. 185: 9287–9293.
  - Pérez-Maldonado, I. N., Trejo-Acevedo, A., Orta-García, S. T., Ochoa-Martinez, Á. C., Varela-Silva, J. A., Pérez-Vázquez, F. J. 2014. DDT and DDE concentrations in the blood of Mexican children residing in the southeastern region of Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(2), 87-93.
  - Persky, V., Piorkowski, J., Turyk, M., Freels, S., Chatterton, R., Dimos, J., Bradlow, L., Chary, L., Burse, V., Unterman, T., Sepkovic, D., McCann, K. 2011. Associations of polychlorinated biphenyl exposure and endogenous hormones with diabetes in post-menopausal women previously employed at a capacitor manufacturing plant. *Environmental Research*. 111: 817–824.
  - Perry, M.J., Ouyang, F., Korrnick, S.A., Venners, S.A., Chen, C., Xu, X., Lasley, B.L., Wang, X. 2006. A prospective study of serum DDT and progesterone and estrogen levels across the menstrual cycle in nulliparous women of reproductive age. *Am J Epidemiol*. 164 (11): 1056-1064.
  - Piperakis, S.M. 2009. Comet assay: a Brief history. *Cell Biol Toxicol*. 25: 1-3.
  - Piperakis, S.M., Kontogianni, K., Karanastasi, G., Iakovidou-Kritsi, Z., Piperakis M.M. 2009. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol*. 25: 65–71.
  - Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo en México. 2007 SEMARNAT. pp 7 y 13.

- Porta, M., Gasull, M., Puigdomènech, E., Rodríguez-Sanz, M., Pumarega, J., Rebato, C., Borrell, C. 2009. Sociodemographic factors influencing participation in the Barcelona Health Survey study on serum concentrations of persistent organic pollutants. *Chemosphere*. 76: 216–225.
- Porta, M., Gasull, M., Puigdomènech, E., Garí, M., Bosch de Basea, M., Guillén, M., López, T., Bigas E., Pumarega, J., Llebaria, X., Grimalt, J.O., Tresserras, R. 2010. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Catalonia. *Environment International*. 36: 655–664.
- Ramadass, K., Palanisami, T., Smith, E., Mayilswami, S., Megharaj, M., Naidu, R. 2016. Earthworm Comet Assay for Assessing the Risk of Weathered Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils: Need to Look Further than Target Contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1-11.
- Rice, J.M., Diwan, B.A., Hu, H., Ward, J.M., Nims, R.W., Lubet, R.A. 1994. Enhancement of hepatocarcinogenesis and induction of specific cytochromes P450-dependent monooxygenase activities by the barbiturates allobarbitol, aprobarbitol, pentobarbitol, secobarbitol, and 5-phenyl- and 5-ethylbarbituric acids. *Carcinogenesis*. 15: 395–402.
- Rignell, A., Rylander, L., Hagmar, L. 2007. Exposure to persistent organochlorine pollutants and type 2 diabetes mellitus. *Hum Exp Toxicol*. 26 (5): 447-452.
- Ritter, L., Solomon, K.R., Forget, J. 1995. Persistent organic pollutants. An Assessment Report on: DDT-Aldrin-Dieldrin-Endrin-Chlordane Heptachlor-Hexachlorobenzene Mirex-Toxaphene Polychlorinated Biphenyls Dioxins and Furans. Canadian Network of Toxicology Centres.
- Rocha-Amador, D., Navarro, M., Trejo-Acevedo, A., Carrizales, L., Pérez-Maldonado, I., Díaz-Barriga, F., 2009. Use of the Rey-Osterrieth complex figure test for neurotoxicity evaluation of mixtures in children. *Neurotoxicology*. 30: 1149–1154.
- Rojas, E., López, M.C., Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr*. 722: 225–254.

- Rowlands, J.C., Gustafsson, J.A. 1997. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol.* 27:109-134.
- Rusiecki, J.A., Baccarelli, A., Bollati, V., Tarantini, L., Moore, L.E., Bonfeld, E.C. 2008. Global DNA Hypomethylation Is Associated with High Serum-Persistent Organic Pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect.* 116 (11): 1547-1552.
- Ruiz-Suárez, L. E., Castro-Chan, R. A., Rivero-Pérez, N. E., Trejo-Acevedo, A., Guillén-Navarro, G. K., Geissen, V., Bello-Mendoza, R. 2014. Levels of organochlorine pesticides in blood plasma from residents of malaria-endemic communities in Chiapas, Mexico. *International journal of environmental research and public health*, 11(10), 10444-10460.
- Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Fujita, T. 1985. PCBs: structure–function relationships and mechanism of action. *Environmental Health Perspectives.* 60: 47-56.
- Santoro, R., Ferraiuolo, M., Morgano, G. P., Muti, P., Strano, S. 2016. Comet Assay in Cancer Chemoprevention. *Cancer Chemoprevention: Methods and Protocols.* 99-105.
- Sala, M., Sunyer, J., Herrero, C. 2001. Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population. *Occup Environ Med.* 58: 172-177.
- Salazar-García, F., Gallardo, E., Cerón, P., Loomis, D., Borja, V. 2004. Reproductive effects of occupational DDT exposure among male malaria control workers. *Environ Health Perspect.* 112 (5): 542-547.
- Saghizadeh, M., Gharaati, M. R., Mohammadi, S., Ghiassi-Nejad, M. 2008. Evaluation of DNA damage in the root cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar–Iran. *Journal of environmental radioactivity.* 99(10), 1698-1702.
- Schmidt, J. V., Bradfield, C. A. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annual review of cell and developmental biology.* 12 (1): 55-89.

- Secretaria de Salud. 2004. Proyecto DDT/GEF. Guía para la implementación y demostración de alternativas sostenibles de control integrado de la malaria en México y América Central. Programa regional de acción y demostración de alternativas sostenibles para el control de vectores de la malaria sin uso de DDT en México y América Central. Secretaria de Salud de México.
- Shao, L., Lin, J., Huang, M., Ajani, J.A., Wu, X. 2005. Predictors of esophageal cancer risk: assessment of susceptibility to DNA damage using comet assay. *Genes Chromosomes Cancer*. 44: 415–422.
- Shugart, L.R. 1992. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*. 9: 329-340.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175: 184-191.
- Singh, N. P., Danner, D. B., Tice, R. R., Brant, L., and Schneider, E. L. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res*. 237: 123–130.
- Smith AG. 2010. Toxicology of DDT and some analogues. In: Krieger R, ed. Hayes's Handbook of Pesticide Toxicology. San Diego: Academic 1975–2032.
- Speit, G., Hartmann, A. 2005. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair, Charpet 9. Keohavong and Grant. *Molecular Toxicology Protocols, Methods in Molecular Biology™* Vol. 291: pp 85-95.
- Stapleton, F. H. 1998. The dawn of DDT and its experimental use by the Rockefeller foundation in Mexico. 1943-1952. *Parasitologia*. 40: 149-158.
- StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Steenland, K., Hein, M.J., Cassinelli, R.T. 2006. Polychlorinated biphenyls and neurodegenerative disease mortality in an occupational cohort. *Epidemiology*. 17: 8–13.



- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. 2008. Risk management evaluation for alpha hexachlorocyclohexane. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its fourth meeting.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2015. Consultado el 01 de noviembre de 2015, en:  
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>
- Sul, D., Lee, D., Im, H., Oh, E., Kim, J., Lee, E. 2002. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicology Letters*. 134: 1-3, p. 87.
- Systat Software Inc, (2008). Sigmaplot for Windows Version 11.0 Build 11.0.0.77
- Tavares, T. M., Beretta, M., Costa, M. C. 1999. Ratio of DDT/DDE in the All Saints Bay, Brazil and its use in environmental management. *Chemosphere*. 38(6), 1445-1452.
- Taylor, K. W. Novak, R. F., Anderson, H., Birnbaum, L.S., Blystone, C., DeVito, M., Jacobs, D., Köhrle, J., Lee, D.H., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Tornero-Velez, R., Turyk, M., Boyles, A., Thayer, K., Lind, L. 2013. Evaluation of the Association between Persistent Organic Pollutants (POPs) and Diabetes in Epidemiological Studies: A National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect*. 121: 774–783.
- Tice, R.R, Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartman, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. 35: 206-221.
- Torres-Dosal, A., Martinez-Salinas, R. I., Hernandez-Benavides, D., Perez-Vazquez, F. J., Ilizaliturri-Hernandez, C., Perez-Maldonado, I. N. 2012. Assessment of the levels of DDT and DDE in soil and blood samples from Tabasco, Mexico. *Environmental monitoring and assessment*. 184(12), 7551-7559.



- Trejo-Acevedo, A., Pérez, I., Díaz, F., Carrizales, L., Domínguez, G., Costilla, R., Ize, I., Yarto, M., Gavilán A, Mejía, J. 2009. Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere*. 74: 974–980.
- Trejo-Acevedo, A., Rivero-Pérez, N.E., Díaz-Barriga, F., Orta-García, S.T., Pérez-Maldonado, I.N., 2012. Assessment of the levels of hexachlorocyclohexane in blood samples from Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88: 833–837.
- Trejo-Acevedo, A., Rivero-Pérez, N., Flores-Ramírez, R., Díaz-Barriga, F., Ochoa, A., Pérez-Maldonado, I.N. 2013 .Assessment of persistent organic pollutants levels in blood samples from Quintana Roo, Mexico. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 216: 284– 289.
- United Nations Environment Programme POPRC.2/8. 2006. Draft risk profile: Chlordecone. Nairobi (KE): UNEP. 26 p.
- United Nations Environment Programme. 2013. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Uses and Environmental Releases. Consultado en septiembre de 2013 en: [http://www.chem.unep.ch/pops/pops\\_inc/proceedings/bangkok/fiedler1.html](http://www.chem.unep.ch/pops/pops_inc/proceedings/bangkok/fiedler1.html)
- United Nations Environment Programme. 2007a. Risk Profile: alpha-hexachlorocyclohexane. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third Meeting, Geneva 19–23 November 2007. UNEP/POPS/POPRC.3/20/Add.8.
- United Nations Environment Programme. 2007b. Risk Profile: beta hexachlorocyclohexane. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third Meeting, Geneva 19–23 November 2007. UNEP/POPS/POPRC.3/20/Add.9.
- Uppangala, S., Pudakalakatti, S., D'souza, F., Salian, S. R., Kalthur, G., Kumar, P., . Adiga, S. K. 2016. Influence of sperm DNA damage on human preimplantation embryo metabolism. *Reproductive Biology*. 16(3), 234-241.
- Viswanathan, S., Hammock, B.D., Newman, J.W., Meerarani, P., Toborek, M., Hennig, B. 2003. Involvement of CYP 2C9 in mediating the proinflammatory effects of linoleic acid in vascular endothelial cells. *J. Am Coll. Nutr.* 22: 502–510.

- WHO (World Health Organization). 2011. Diabetes Programme: Facts and Figures. Consultado el 12 de diciembre de 2011, en: <http://www.who.int/diabetes/facts/en>
- Wild, S., McLagan, D., Schlabach, M., Bossi, R., Hawker, D., Cropp, R., Nash, S. B. 2014. An Antarctic research station as a source of brominated and perfluorinated persistent organic pollutants to the local environment. *Environmental science & technology*. 49(1), 103-112.
- Wong, F., Alegria, H. A., Jantunen, L. M., Bidleman, T. F., Salvador-Figueroa, M., Gold-Bouchot, G., Infanzon, R. 2008. Organochlorine pesticides in soils and air of southern Mexico: chemical profiles and potential for soil emissions. *Atmospheric environment*. 42(33), 7737-7745.
- Wong, F., Alegria, H. A., Bidleman, T. F. 2010. Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil-air exchange. *Environmental Pollution*. 158(3), 749-755.
- Yáñez, L., Ortiz-Pérez, D., Batres, L. E., Borja-Aburto, V. H., Díaz-Barriga, F. 2002. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of Mexico. *Environmental Research*. 88(3), 174-181
- Yáñez, L., Borja-Aburto, V., Rojas, E., De la Fuente, H., González-Amaro, R., Gómez, H., Jongitud, A., Díaz-Barriga, F. 2004. DDT induces DNA damage in blood cells. Studies in vitro and in women chronically exposed to this insecticide. *Environ. Res*. 94: 18–24.
- Yıldız, M., Ciğerci, İ. H., Konuk, M., Fidan, A. F., Terzi, H. 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*. 75(7), 934-938.
- Zhang, Z. L., Hong, H. S., Zhou, J. L., Huang, J., Yu, G. 2003. Fate and assessment of persistent organic pollutants in water and sediment from Minjiang River Estuary, Southeast China. *Chemosphere*. 52(9), 1423-1430.
- Zúñiga, L. A. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis Doctoral. Grupo de Mutagénesis de la Unidad de Genética de la Universidad Autónoma de Barcelona.

## Capítulo 11. ANEXOS

### 11.1 Anexo I. Factores que alteran la fragmentación del ADN.

Cuadro 3. Factores que alteran la fragmentación del ADN.

Factores que alteran la fragmentación del ADN	Efecto
Edad	En humanos adultos mayores (70-80 años) se reporta mayor daño al ADN en células mononucleares expuestas a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Luz UV que en niños (5-10 años) y en adultos (40-50 años) (Piperakis et al., 2009).
Genero	Moller, (2006) indica que hay indicios de que los hombres muestran cantidades ligeramente más altas de daño en el ADN que las mujeres en la versión alcalina convencional de la prueba del cometa, mientras que esta tendencia no es detectable por la endonucleasa III (Endo III) o en los sitios sensibles a glicosilasa (FPG).
Consumo de tabaco	Hoffman et al., 2005 se encontraron con una indicación de que los niveles de daño al ADN fueron mayores en voluntarios fumadores en comparación con voluntarios no fumadores.
Consumo de alcohol	Se ha encontrado aumentó en el daño genético en voluntarios alcohólicos, sin embargo, en voluntarios abstemidos al consumo de alcohol durante un año también aumenta el daño genético y no presentan una diferencia significativa (Ishikawa et al., 2006).
Ejercicio físico	Battershill et al., (2008) reportan aumento en el daño genético en atletas entrenados en comparación con voluntarios que no realizan ejercicio físico riguroso.
Exposición a radiación ultravioleta y su relación con la temperatura.	Ayala et al., (2004) reportan que las roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali detectados por el ensayo cometa pueden afectarse por la temperatura, de modo que el daño al ADN causado por exposición a radiación UV se repara difícilmente a temperaturas de 15-37 °C no así en temperaturas de 4 °C donde observó la reparación del ADN.
Dieta alimenticia	El consumo de antioxidantes como las vitaminas C y E generan resistencia al daño basal al ADN generado por exposición a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> o en exposición a radiación ionizante (Green et al., 1996).

## 11.2 Anexo II. Encuesta

Instrucciones: Contesta las siguientes preguntas y marca con una X sobre la línea tu respuesta.

1. Folio: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ años. Sexo: \_\_\_\_\_.
2. Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_.
3. Lugar de origen: \_\_\_\_\_.
4. Residencia actual: \_\_\_\_\_.
5. Tiempo de residencia en su domicilio actual: \_\_\_\_\_.
6. Ocupación: \_\_\_\_\_.
7. Tiempo de desempeñar esa ocupación: \_\_\_\_\_ años.
8. Tiempo de trabajo diario: \_\_\_\_\_ Horas.
9. ¿Ha realizado o realiza aspersión de plaguicidas? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_
10. Tipo de plaguicidas que ha utilizado: \_\_\_\_\_
11. ¿Utiliza equipo de seguridad para asperjar los plaguicidas? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_  
¿Cuales? \_\_\_\_\_
12. ¿Deposita en algún lugar especial la ropa o equipo de seguridad con el que asperja plaguicidas? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_ ¿Dónde? \_\_\_\_\_
13. ¿La ropa o equipo de seguridad que utiliza al trabajar puede estar al alcance de niños? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_
14. ¿Rociaron en algún momento DDT o plaguicidas en su hogar para el control de paludismo o malaria? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_
15. ¿Cuándo fue la última vez que rociaron DDT en su vivienda?  
\_\_\_\_\_
16. ¿Depositán en algún lugar especial envases de plaguicidas? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_  
¿Dónde? \_\_\_\_\_
17. ¿Utilizan envases de plaguicidas en su vivienda? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_ ¿De qué forma? \_\_\_\_\_
18. ¿Recibe atención médica por parte de alguna organización? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_
19. ¿Cuál? \_\_\_\_\_
20. ¿Ha tenido alguna intoxicación con plaguicidas o algún otro agroquímico? Si: \_\_\_\_\_  
No: \_\_\_\_\_
21. ¿Con qué plaguicida? \_\_\_\_\_
22. ¿Padece algún malestar (Dolor de cabeza, dolor de estómago, náuseas, mareo, ronchas en la piel, ardor en ojos) cuando se encuentra en contacto de plaguicidas o en el horario de trabajo? Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_ ¿Qué malestar persiste más? \_\_\_\_\_
23. ¿Tiene alguno de los siguientes padecimientos?  
Glucosa elevada: \_\_\_\_\_ Colesterol elevado: \_\_\_\_\_ Triglicéridos elevados: \_\_\_\_\_  
Problemas respiratorios: \_\_\_\_\_ Hipertensión: \_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_
24. ¿Se encuentra bajo algún tratamiento médico?  
Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_
25. ¿Qué tratamiento recibe?  
R: \_\_\_\_\_

26. Realiza ejercicio rutinario:  
Si: \_\_\_ Tipo de ejercicio: \_\_\_\_\_. No: \_\_\_
27. ¿Con que frecuencia realiza ejercicio?  
1 vez por semana: \_\_\_ 3 veces por semana: \_\_\_ 5 veces por semana: \_\_\_  
Diario: \_\_\_
28. ¿Usted fuma?  
Si: \_\_\_ No: \_\_\_
29. ¿Con que frecuencia fuma?  
1 vez por semana: \_\_\_ 3 veces por semana: \_\_\_ 5 veces por semana: \_\_\_  
Diario: \_\_\_
30. ¿Consume alcohol?  
Si: \_\_\_ No: \_\_\_
31. ¿Con que frecuencia consume alcohol?  
1 vez por semana: \_\_\_ 3 veces por semana: \_\_\_ 5 veces por semana: \_\_\_  
Diario: \_\_\_
32. ¿Tiene problemas de problemas de estrés? Si: \_\_\_ No: \_\_\_
33. Para quitar el estrés usted:  
Fuma: Si: \_\_\_ No: \_\_\_. Consume alcohol: Si: \_\_\_ No: \_\_\_. Consume drogas:  
Si: \_\_\_ No: \_\_\_.  
Tiene tratamiento médico: Si: \_\_\_ No: \_\_\_. Realiza algún deporte Si: \_\_\_ No: \_\_\_.

### 11.3 Anexo III. Carta de consentimiento

#### CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN.

Folio						
Fecha de nacimiento dd/mm/aa						
Fecha de llenado dd/mm/aa						
Género	Masculino <input type="checkbox"/>	Femenino <input type="checkbox"/>				

Los problemas causados por exposición ambiental a Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) es un posible mal persistente que afecta a las personas que trabajan como jornaleros en el Sur de México, convirtiéndose en un problema de salud pública. Como parte de las labores que realiza la Colegio de la Frontera Sur se encuentran el realizar investigaciones para contribuir a encontrar soluciones a los problemas actuales de salud, entre los cuales se encuentra las enfermedades causadas por exposición a COPs. Por ello se ha planteado el proyecto de investigación titulado: **“Evaluación de la genotoxicidad y su relación con la exposición a COPs en familias de jornaleros de la caña de azúcar en el Sureste de México”** en la cual se evaluará el efecto genético causado por la exposición a COPs en jornaleros del Sureste de México. Esta carta de consentimiento informado tiene la finalidad de obtener su aceptación para participar en este proyecto, así como también informarle de los procedimientos y objetivos de esta investigación.

Al firmar este consentimiento de participación nos otorga el permiso para utilizar los datos obtenidos en su encuesta, necesarios para la interpretación de los resultados del estudio y nos autoriza para tomar una muestra de material biológico (4 ml sangre venosa periférica) para la realización de estudios de evaluación genética. Toda información que se obtenga se mantendrá anónima, no se publicará ningún tipo de información personal que relacione sus datos con las muestras biológicas. Su participación no implica ningún riesgo.

Este estudio se compone de dos partes:

1. Encuesta. Tiene como finalidad obtener datos importantes que nos permitirán clasificar los resultados obtenidos en nuestro estudio.
2. Muestra de material biológico. Al firmar el consentimiento de participación está aceptando donar una muestra de su sangre (4 ml), la cual se obtendrá mediante una punción venosa convencional.

¡AYÚDENOS A AYUDAR!

Si **ACEPTA** participar en el proyecto deberá firmar en los recuadros de la parte inferior. Si es menor de 18 años, tanto usted como sus padres deberán firmar esta carta.

Yo (nombre y/o firma) _____ entiendo la información y las características de este proyecto, por lo tanto <b>ACEPTO</b> participar voluntariamente en este estudio de investigación.	
ACEPTO DONAR <input type="checkbox"/>	Información recabada en la encuesta.
<input type="checkbox"/>	Muestra sanguínea

## 11.4 Anexo IV. Técnica para la ejecución del Ensayo cometa

### 1.- Preparación de soluciones

#### 1.1 Preparación de agarosa regular al 1%

Para preparar la agarosa de normal punto de fusión (Agarosa NMP), (Agarose Type II, Medium EEO, *Marca Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>, CAS: 9012-36-6, Pcode: 1001037543, A6877-25G, Lot#011M1984V), al 1% se pesan 0.25 g de agarosa y se disuelve en 25 ml de agua desionizada en un matraz erlenmeyer de 100 ml (*Marca PYREX*), (si se necesita preparar una cantidad menor solamente se pesa el 1% de la cantidad total de solución necesaria en caso de necesitar 10 ml de solución se pesan 0.1 g de Agarosa NMP). Para ayudar a disolver se utiliza la placa de calentamiento (*Marca Corning Laboratory, Stirrer/Hot Plate 6795-420D, Lot No. 26610501, Serial No. 133510266245, Listed 4D17*) a una temperatura de 60 °C y se agita con un Spinbar Teflon Polygon (Magnetic Stirring Bars ½"X 5/16", *Marca Scienceware, Cat No. 3710012*); de esta manera se procede de forma repetitiva hasta que se disuelva completamente. El matraz erlenmeyer con la solución de agarosa al 1 % se deja a una temperatura de 40 °C mientras se utiliza.

#### **Precauciones y recomendaciones**

- Iniciar el calentamiento en la placa a 150 °C, (para disolver más rápido) posteriormente se baja 60 °C hasta disolver claramente la agarosa.
- La agarosa **no debe hervir**, si esto sucede, se prepara de nuevo.
- Se debe de cuidar que la agarosa **este bien disuelta** y que no se observen residuos en suspensión por lo que deberá tener una tonalidad completamente transparente. Si esto no sucede se deberá preparar de nuevo.
- Si baja la temperatura y la agarosa se **solidifica** se debe de preparar de nuevo.
- Cada que se utiliza la agarosa se prepara en el momento de aplicarla, no puede almacenarse para utilizar posteriormente.

#### 1.2 Preparación de la solución de lisis

Se pesan: 146.1 g de **Cloruro de Sodio** QP (NaCl), (2.5 M) (*Marca Fermont, CAS: 7647-14-5, Lote: 118309*), 1.2 g de **Trizma**<sup>®</sup> **base** (10 mM) (*Marca Sigma*<sup>®</sup> *Life Science, CAS: 77-86-1, Pcode 101044526, 93362-250G, Lot#BCBF0078V*), 8 g de **Hidróxido de Sodio** (NaOH), (0.2 M) (*Marca CTR Scientific, Lote No. 63TSCAB1210110, CTR 03308*) y 37.2 g de **Ethylenediaminetetra-acetic acid** (EDTA), (100 mM) (*Marca Aldrich*<sup>®</sup>)

*Chemistry*, CAS: 60-00-4, 431788-100G, Batch #: MKBB0739) para disolverse en 890 ml de agua desionizada. En una placa de calentamiento (*Marca Corning Laboratory Stirrer/Hot Plate 6795-420D*, Lot No. 26610501, Serial No. 133510266245, Listed 4D17) se coloca un vaso de precipitado de 1 L (*Marca KYMEX*) y se agrega agua desionizada cuidando no utilizar todo el volumen. Los reactivos se agregan en el siguiente orden: 1) NaCl, 2) Trizma base y 3) de forma alternada el NaOH y el EDTA y se disuelven con ayuda de un Spinbar Teflon Polygon (Magnetic Stirring Bars 1"X 3/8", *Marca Scienceware*, Cat No. 371200038). Cuando los reactivos están disueltos, se mide el pH en el potenciómetro (*Marca Hanna Instruments*, modelo HI 3221 pH/ORP/ISE Meter, SN 08260838), el cual deberá tener un valor de 10 (Checar Anexo I, "Manejo del potenciómetro"). Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de NaOH, (*Marca CTR Scientific*, Lote No. 63TSCAB1210110, CTR 03308) para elevar los valores de pH; en el caso que los valores de excedan el valor de 10, se deberá de aplicar HCl (*Marca CTR Scientific*, CTR 00656, Lote No. 29US021252) para ajustar los valores de pH. Se agregan 100 ml de Dimethyl sulfoxide (DMSO), (10 %) (*Marca Sigma<sup>®</sup> Life science*, CAS: 67-68-5, Pcode: 1000929357, D8418-100ml, Lot#84596JMV) y 10 ml de Tritón<sup>®</sup> 100 X (1 %), (*Marca Sigma<sup>®</sup> Life science*, CAS: 9002-93-1, Pcode: 1000998145, Lot#: MKBF3357V) a la solución. La solución se afora en un matraz (*Marca KYMEX*) de 1L y se filtra posteriormente con papel filtro (*Marca Whatman<sup>™</sup>*, 1 Qualitative, Circles, 125mmØ, Cat No. 1001125) para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado (nombre de la solución concentración y fecha). La solución deberá de almacenarse en refrigerador a 4 °C durante por lo menos 1 h para antes de ser utilizada.

### ***Precauciones y recomendaciones***

- Se deberá de **calibrar previamente el potenciómetro** antes de efectuar las mediciones.
- Es importante **aplicar de forma alternada** el NaOH y el EDTA, así como el uso de agitador magnético para facilitar disolverse.
- Es importante considerar el **manejo apropiado** del ácido clorhídrico HCl y el NaOH en campana de extracción.
- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.



### 1.3 Preparación de la solución para electroforesis

Se pesan 200 g de NaOH, 10 N (*Marca CTR Scientific*, Lote No. 63TSCAB1210110, CTR 03308) para disolverse en 500 ml de agua desionizada. La solución se deberá de preparar en una campana de extracción y con la ayuda de la placa de calentamiento (*Marca Corning Laboratory Stirrer/Hot Plate 6795-420D*, Lot No. 26610501, Serial No. 133510266245, Listed 4D17). Las perlas de NaOH se deberán de agregar de forma paulatina en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse con ayuda de un Spinbar Teflon Polygon (Magnetic Stirring Bars 1"X 3/8", *Marca Scienceware*, Cat No. 371200038) y la función de agitación de la misma placa de calentamiento. La solución se afora en un matraz (*Marca KYMEX*) de 500 ml y se filtra posteriormente con papel filtro (*Marca Whatman™*, 1 Qualitative, Circles, 125mmØ, Cat No. 1001125) para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado (nombre de la solución concentración y fecha). La solución deberá de almacenarse en refrigerador a 4 °C. Posteriormente, se pesan 3.72 g de Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), (100 mM) (*Marca Aldrich® Chemistry*, CAS: 60-00-4, 431788-100G, Batch #: MKBB0739) (200 mM) para disolverse en 50 ml de agua desionizada. Se deberán de agregar de forma paulatina el EDTA en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. Cuando el reactivo este disuelto, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 10. Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de NaOH para elevar los valores de pH. En el caso que los valores excedan el valor de 10, se deberá de aplicar HCl para ajustar los valores de pH. La solución se afora en un matraz (*Marca KYMEX*) de 50 ml y se filtra posteriormente con papel filtro (*Marca Whatman™*, 1 Qualitative, Circles, 125mmØ, Cat No. 1001125) para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado (nombre de la solución concentración y fecha). La solución deberá de almacenarse en refrigerador a 4 °C y protegerse de la luz.

Finalmente, la **solución amortiguadora para electroforesis** se prepara con: 60 ml de NaOH (10 N) y 10 ml de EDTA (200 mM) (preparado anteriormente cada uno) y 1,544 de agua desionizada. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 13 o mayor. Con una pipeta Pasteur de plástico se deberá de agregar gota a gota una solución de NaOH para elevar los valores de pH. En el caso que los valores de

excedan el valor de 10, se deberá de aplicar HCl para ajustar los valores de pH. La solución se afora en un matraz volumétrico de 2000 ml y se filtra posteriormente con papel filtro (*Marca Whatman<sup>TM</sup>*, 1 Qualitative, Circles, 125mmØ, Cat No. 1001125) para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado (nombre de la solución concentración y fecha). La solución deberá de almacenarse en el refrigerador a 4 °C.

#### ***Precauciones y recomendaciones***

- Se deberá de **calibrar previamente el potenciómetro** antes de efectuar las mediciones.
- Es importante considerar el **manejo apropiado** del HCl y el NaOH.
- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.
- Se deberá de colocar papel encerado en los tapones de los frascos para evitar que se peguen.

#### **1.4 Preparación de la Trizma<sup>®</sup>**

Se pesan 12.12 g de Trizma<sup>®</sup> base (0.4 M), (*Marca Sigma<sup>®</sup> Life Science*, CAS: 77-86-1, Pcode 101044526, 93362-250G, Lot#BCBF0078V) para disolverse en 250 ml de agua desionizada. El Trizma<sup>®</sup> se deberá de agregar de forma paulatina en un vaso de precipitado (*Marca KYMEX*) con agua desionizada hasta disolverse. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 7.5, de lo contrario se procederá al ajuste de este. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. La solución se afora en un matraz (*Marca KYMEX*) de 250 ml y se filtra posteriormente con papel filtro (*Marca Whatman<sup>TM</sup>*, 1 Qualitative, Circles, 125mmØ, Cat No. 1001125) para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado (nombre de la solución concentración y fecha). La solución deberá de almacenarse en refrigerador a 4 °C.

#### ***Precauciones y recomendaciones***

- Se deberá de **calibrar previamente el potenciómetro** antes de efectuar las mediciones.
- Es importante considerar el **manejo apropiado** del HCl y el NaOH.
- Se deberá de colocar papel encerado en el tapón de los frascos para evitar que se pegue.
- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.

#### **1.5 Preparación de solución de lisis en el coplin**

En cada jarra coplin se agregan 50 ml de la solución de lisis previamente preparada. La solución se vierte al coplin con una probeta graduada (*Marca KYMEX*). El coplin deberá de almacenarse en refrigerador a 4 °C por lo menos una hora antes de su uso.

#### ***Precauciones y recomendaciones***

- Las laminillas deberán de permanecer **por lo menos una hora** en el coplin antes de pasar a la electroforesis.
- El tiempo de duración de las laminillas en el coplin no debe de exceder 2 semanas de almacenaje.

#### **1.6 Preparación de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %**

Para preparar la agarosa de bajo punto de fusión (Agarosa LMP), (Agarose, Type I, Low EEP, Sigma-Aldrich®, CAS: 9012-36-6, Pcode: 1001077713, A6012-25G, Lot#120M0463V) se pesan un 0.125g de agarosa y se disuelve en 25 ml de agua desionizada. Para ayudar a disolver se utiliza la placa de calentamiento (*Marca Corning Laboratory, Stirrer/Hot Plate 6795-420D, Lot No. 26610501, Serial No. 133510266245, Listed 4D17*) a una temperatura de 55 °C aproximadamente y se agita con un Spinbar Teflon Polygon (Magnetic Stirring Bars ½"X 5/16", *Marca Scienceware, Cat No. 3710012*); de esta manera se procede de forma repetitiva hasta que se disuelva completamente. El matraz erlenmeyer con la solución de agarosa al 0.5 % se deja a una temperatura de 36 °C mientras se utiliza.

Si se necesita un menor volumen de solución de pesa el 0.5 % del volumen de la solución total en caso de requerir 10 ml de solución de Agarosa LMP se pesan 0.05g de Agarosa LMP y se disuelven en 10 ml de agua desionizada.

#### ***Precauciones y recomendaciones***

- La agarosa **no debe hervir**, si esto sucede, se prepara de nuevo.
- Se debe de cuidar que la agarosa **este bien disuelta** y que no haya residuos en suspensión por lo que deberá tener una tonalidad completamente transparente. Si esto no sucede se deberá preparar de nuevo
- Si baja la temperatura y la agarosa se **solidifica** se debe de preparar de nuevo.
- De preferencia la agarosa **no debe almacenarse** para usarse en otros ensayos posteriores.

#### **1.7 Preparación de bromuro de etidio**

### Solución stock

Se pesan 0.002 g de bromuro de etidio ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ ) y se disuelven en 10 ml de agua desionizada. A partir de esta solución se prepara una solución de trabajo (para la lectura de las células), para lo cual se toma 1 ml de la solución stock y se disuelve en 9 ml de agua desionizada. La concentración final del bromuro de etidio deberá es de 0.05mM.

### **Precauciones y recomendaciones**

- Las soluciones de bromuro de etidio deben de ser protegidas de la luz directa por lo que la preparación deberán hacerse en un frasco de vidrio ámbar o en su defecto en tubos cónicos de polipropileno cubiertos con papel aluminio.
- El manejo del bromuro de etidio debe hacerse en todo momento con guantes de nitrilo, cubrebocas y debe evitarse el contacto directo con la piel.

### **2.- Preparación de camas (cubrir los portaobjetos con una capa de agarosa regular)**

Se colocan los portaobjetos esmerilados (Microscope Slides Frosted, 25.4x76.2mm, *Marca Pearl*, Cat No. 7105) a utilizar con el esmerilado hacia arriba en un vaso de precipitado (*Marca KYMEX*) con Alcohol Etílico Abs. (*Marca CTR Scientific*, CTR 01168, Lote No. 031S2926), se tapan con Parafilm® y se dejan por un tiempo mínimo de 15 minutos para eliminar el exceso de grasa de los portaobjetos. Mientras el tiempo transcurre se toma gasa absorbente (*Marca Ideal*®) de la caja porta gasas. Se preparan con papel aluminio las charolas donde se colocaran las laminillas. Con la ayuda de guantes de látex, las laminillas se toman con una pinza por el lado esmerilado y se limpian con la gasa por ambos lados para quitar el exceso de grasa que pudieran tener. Posteriormente se colocan en la charola y se rotulan por la parte esmerilada.

A cada portaobjetos o laminilla esmerilado se le colocan 150 µl de agarosa regular preparada anteriormente utilizando la micropipeta (*Marca Eppendorf Research*®, de 20-200 µl, 236506A, US-Patent No. 5,531,131, Cat No.: 022472054). La agarosa se distribuye con la ayuda de la punta del dedo (sin guante en la mano) por toda la laminilla (sin distribuir sobre la parte esmerilada). Las laminillas con la cama de agarosa se colocan en las charolas y se secan en el horno una temperatura de 65-70°C. Una

vez que estén bien secas y frías las laminillas pueden ser almacenadas en cajas porta-laminillas.

### **Precauciones y recomendaciones**

- Se deberá de **utilizar guantes** en este procedimiento.
- Se deberá de tener las **manos limpias** para la distribución de la agarosa en la laminilla.
- Se deberá de tener cuidado de **no pasar muchas veces el dedo** en la laminilla, lo que podría causar una cama irregular.
- Las laminillas se deben de **utilizar antes de 2 semanas**, de lo contrario se desechan.

### **2.1 Preparación de las muestras para el ensayo**

Se obtiene la sangre del voluntario en un Tubo Vacutainer con Heparina de Sodio como anticoagulante (Marca BD Vacutainer® Sodium Heparine No Ref 367878, Lot 0307059, 6.0 ml) con ayuda de la aguja vacutainer y el soporte para vacutainer (Marca BD Vacutainer® PrecisionGlide™ Multiple Sample Needle, Ref 360213, Lot: 1109728), se rotula con el número de folio o nombre del voluntario, fecha de toma de muestra y se coloca en un agitador. Se colocan los tubos de microcentrifuga (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, 2 ml, *Marca Sorenson™* Dolphin Cat# 16140, Lot#: 295448-T22824) debidamente etiquetados en gradilla con tapa. Se toman **15 µl** de sangre con la micropipeta (*Marca Eppendorf Research®*, de 2-20 µl, 236216A, US-Patent No. 5,531,131, Cat No.: 022471953) y de colocan en el fondo del tubo de microcentrifuga correspondiente, después se colocan **225 µl** con la micropipeta (*Marca Eppendorf Research®*, de 100-1000 µl, 237664A, US-Patent No. 5,531,131, Cat No.: 022472101) de agarosa de bajo punto de fusión y se homogeniza con el Vortex-Genie® 2 (*Marca Scientific Industries, Inc.* U.S. Patent No. 4,781,487 Model No. G560). De la mezcla, se toman **75 µl** con micropipeta (*Marca Eppendorf Research®*, de 2-20 µl, 236216A, US-Patent No. 5,531,131, Cat No.: 022471953) y se colocan sobre la cama en la laminilla correspondiente, enseguida se coloca un cubreobjetos (*Marca Corning, Cover Glass 24x50mm* Cat No. 2935). Las laminillas se colocan en la charola para llevarse a refrigeración por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se retira de forma delicada el cubreobjetos de la laminilla y se le agrega **75 µl** u **80 µl** de agarosa de bajo punto de

fusión. Se coloca un nuevo cubreobjetos y se pone en la charola para llevarse a refrigeración por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se retira de forma cuidadosa el cubreobjetos y se desecha en el contenedor de desechos punzocortantes color rojo.

### **3.- Lisis celular en las laminillas**

Una vez fijada la muestra en cada laminilla se incubaron en solución de lisis utilizando Tritón 100X al 1 % (como detergente para remover la membrana celular y proteínas plasmáticas), durante un tiempo de 2 horas a una temperatura de 4-6°C.

#### ***Precauciones y recomendaciones***

- La sangre tiene una **viabilidad para su uso en el ensayo de 3 horas** aproximadamente.
- La aguja vacutainer se desecha cuidadosamente en el frasco contenedor color rojo, retirar la aguja vacutainer del soporte con ayuda de la hendidura en la tapa del contenedor rojo.
- Se deberá de tener cuidado al colocar la mezcla de sangre con agarosa en la laminilla para **no formar burbujas**.
- Se deberá de tener cuidado al colocar mezcla de **no tocar la cama de agarosa** en la laminilla con la punta de la pipeta.
- Se deberá de tener cuidado de **colocar espalda con espalda** las laminillas en el coplin para evitar el daño de las muestras.
- Las laminillas deberán de tener **por lo menos una hora en la solución de lisis** en el coplin.
- Las laminillas se deben de sacar del coplin **antes de 2 semanas**, de lo contrario se pierde la muestra.

### **3.-Desnaturalización de ADN y Electroforesis**

Para realizar la electroforesis se realizan los siguientes pasos cuidadosamente:

3.1 Se coloca la cámara de electroforesis (*Marca Cleaver scientific Ltd*, Stock Code: CSL-COM20, Serial Number: CSL 11606021) en la mesa, asegurándose de que está centrada por la burbuja indicadora, de lo contrario se ajusta de las patas hasta la posición adecuada.

3.2 La cámara de electroforesis se conecta a la fuente de poder (*Marca Cleaver*

*scientific Ltd*, Model: CS-300V, Serial No.: 110512143) de acuerdo con el color y la polaridad de los cables (rojo-positivo, negro-negativo). El trabajo hasta este momento se realiza en completa oscuridad, con la finalidad de no dañar el DNA con la luz.

- 3.3 Se conectan las mangueras de alimentación (Feed) y retorno (Return) por la parte trasera del enfriador (Marca Julabo Labortechnik GmbH, Model F250, 962002502, No. De Serie 10175929) con las mangueras de entrada y salida de la cámara de electroforesis. Se llena el compartimento (este se encuentra arriba del enfriador) con agua desionizada hasta la segunda marca del contenedor (este se encuentra al frente del enfriador). Se conecta el cable de corriente del enfriador y se ajusta la temperatura requerida (5 °C) con ayuda de los botones “abajo” o “arriba” según sea el caso, posteriormente se mantiene presionada el botón hacia abajo y se presiona la tecla “enter” al mismo tiempo para iniciar los reflujos a 5 °C (se esperan 15 minutos hasta tener la temperatura deseada).
- 3.4 Se coloca la solución de electroforesis en la cámara, hasta la plataforma por ambos lados, sin que la solución se junte. Después se colocan las laminillas en la cámara (muestras o repeticiones) con pinzas por la parte esmerilada y asegurándose que está este en la dirección correcta.
- 3.5 Colocadas las laminillas se vierte la solución de electroforesis hasta cubrir las laminillas, asegurándose que no queden burbujas debajo de las laminillas y de no excede el nivel de la solución de electroforesis de 1 cm como máximo sobre las laminillas. Las laminillas se dejan reposar en la solución de electroforesis durante 25 minutos para desnaturalizar el ADN de las muestras.
- 3.6 Se conecta la fuente de poder a la corriente eléctrica, se enciende y se configuran los parámetros de la fuente de poder a **25 V, 300 mA y 25 minutos** (Azqueta et al., 2011).
- 3.7 Transcurrido el tiempo de las laminillas, en la solución de electroforesis, se coloca la tapa de la cámara de electroforesis y se procede a iniciar el funcionamiento de la fuente de poder con los parámetros configurados previamente. Se observa unos segundos la formación de espuma y un valor constante de 300 mA lo que indica que la electroforesis se está llevando a cabo correctamente. Si el valor de 300 mA

disminuye, se deberá colocar más solución de electroforesis por los orificios de la parte superior de la cámara hasta obtener el valor deseado. Transcurrido el tiempo el voltaje marca E y se apaga la fuente, para quitar la tapa de la cámara de electroforesis.

3.8 Las laminillas se sacan con las pinzas y se secan por debajo con papel absorbente y se colocan en la charola de lavados.

#### ***Precauciones y recomendaciones***

- Se debe de asegurar de **enjuagar las pinzas** antes de tomar otra laminilla.
- Se debe de asegurar la parte posterior de la laminilla, de lo contrario se perderá la muestra.
- Se deberá de tener cuidado de **colocar espalda con espalda** las laminillas para evitar el daño de las muestras.
- Se debe de asegurar la **dirección correcta** para la realización de la electroforesis.

#### **4.- Neutralización y lavado de laminillas**

Se agrega 2 ml por muestra de solución Trizma base pH 7.5 para neutralizar las laminillas con ayuda de una pipeta Pasteur y se dejan reposar 5 minutos; transcurrido el tiempo el procedimiento se repite. Se escurren y se aplican 2 ml de alcohol anhidro por muestra con ayuda de una pipeta Pasteur y se dejan reposar 5 minutos; transcurrido el tiempo el procedimiento se repite. Finalmente las laminillas se escurren y son colocadas en un coplin con alcohol anhidro por otros 5 minutos, terminado el tiempo se sacan y se limpian por debajo con gasa, al secarse se guardan en una caja porta-laminillas.

#### **5.- Tinción y visualización**

La visualización de la fragmentación de ADN se realiza empleando bromuro de etidio (BrEt) (Marca Sigma) 0.05 mM como revelador y el microscopio de fluorescencia (marca Carl Zeiss modelo Axio Lab A1) acoplado a un equipo de cómputo cargado previamente con el programa Axiovision 4.8.2 y conectado por medio de la cámara monocromática (marca AxioCam ICm1) para obtener las imágenes. Consecutivamente se tiñen las laminillas con 25 µl de BrEt y se colocó un cubreobjetos, se enfocó la imagen empleando el objetivo 20 X hasta ver de forma adecuada el campo. Después se



capturaron 50 imágenes de las células por laminilla que presentaban cometas y/o células normales.

## 11. 5 Anexo V. Determinación de COPs por Cromatografía de gases-masas.

Determinación de plaguicidas organoclorados y PCBs por Cromatografía de gases-masas.

Para realizar la determinación y cuantificación de los doce plaguicidas organoclorados ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -HCH, aldrina, oxiclordano, trans-clordano, trans-nanoclor, cis-nanoclor, p,p'-DDE, p,p'-DDT, mirex, heptacloro epóxido) y 14 congéneres de PCBs (International Union for Pure and Applied Chemistry no. 28, 52, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180, 183, 187) se separaron 2 ml de suero de la muestra sanguínea.

A partir de una alícuota de 2 ml de suero, se hizo una extracción con una mezcla de sulfato de amonio/etanol/hexano (1:1:3), posteriormente el extracto se concentró y purificó en columnas de florisil.

El análisis cuantitativo se realizó utilizando un cromatógrafo de gases (GC) *Agilent model HP 6890* acoplado a un espectrómetro de masas *marca Agilent modelo HP 5973*. Se utilizó una columna, HP5-MS, 60 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m de espesor película (J&W Scientific, Bellefonte, PA, USA). Las temperaturas de la columna fueron las siguientes: inicial, 100°C (2 min), final, 310°C (rampas: 20°C/min hasta 200°C, 10°C/min hasta 245°C, 4°C/min hasta a 280°C y 30°C/min hasta 310°C). La temperatura del inyector fue de 270°C operado en modo splitless pulsado. Se añadieron  $\alpha$ -Hexachlorociclohexane-C13, Endrín-C13 y PCB-141-C13 como estándares internos a todas las muestras.

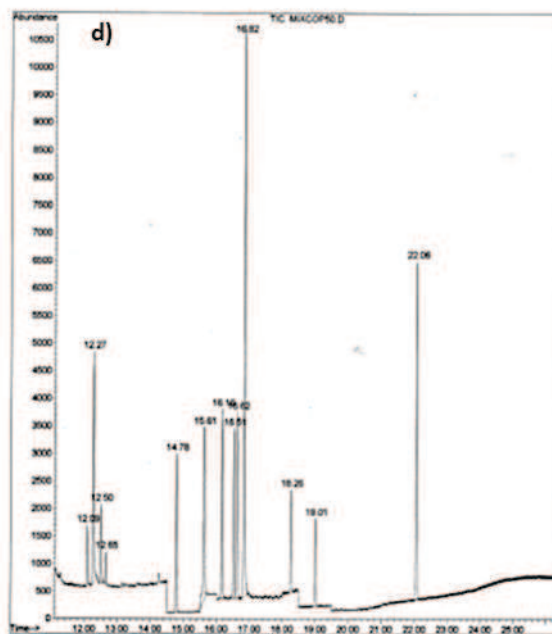
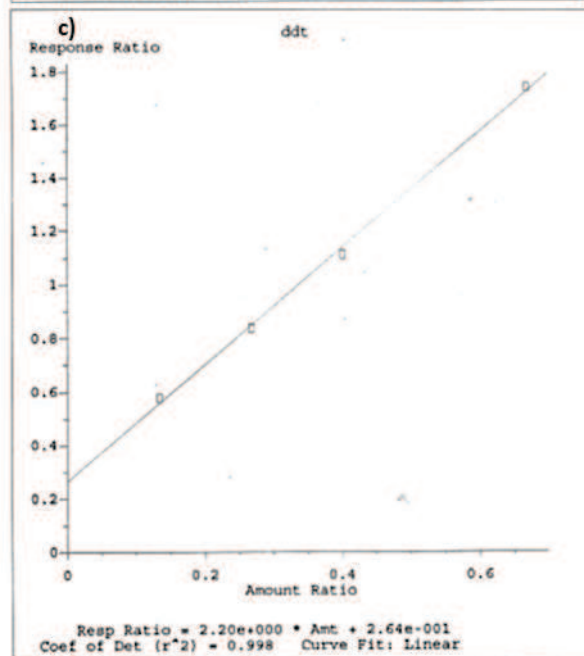
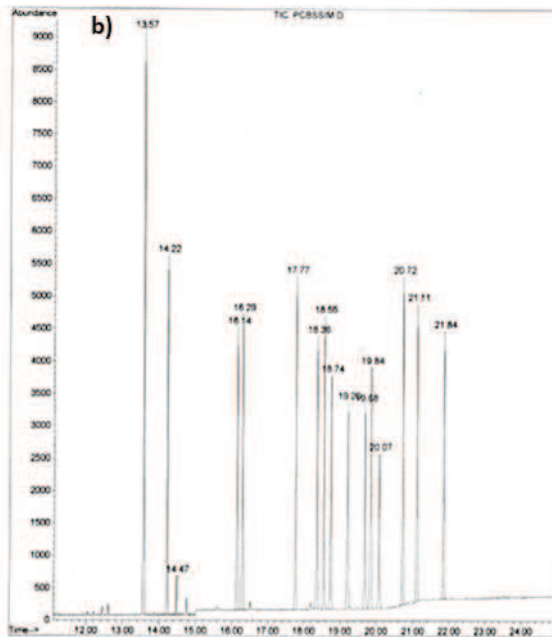
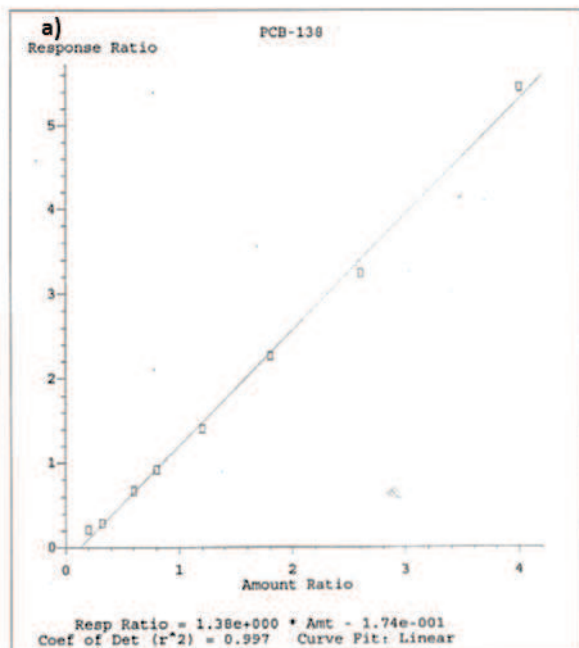
Se empleó helio como gas acarreador a una velocidad lineal de 1 ml/min, con estas condiciones y utilizando los datos de nueve replicas cerca de la concentración más baja detectable en la curva de calibración. Para el control de calidad, fue usado un suero humano enriquecido con contaminantes orgánicos [National Institute of Standards and Technology (NIST) SRM 1958]. Asimismo, cabe mencionar que la eficiencia de extracción fue del 90-100 % para todos los compuestos analizados.

Los límites de detección de presentan a continuación:

**Límites de detección (LOD) de los compuestos organoclorados analizados**

<b>Compuesto</b>	<b>LOD (ppb)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>LOD (ppb)</b>
<b>α-HCH</b>	0.05	<b>PCB52</b>	0.02
<b>β-HCH</b>	0.11	<b>PCB99</b>	0.05
<b>γ-HCH</b>	0.13	<b>PCB101</b>	0.08
<b>Aldrina</b>	0.07	<b>PCB105</b>	0.01
<b>Oxyclordano</b>	0.08	<b>PCB118</b>	0.02
<b>Trans-Clordano</b>	0.05	<b>PCB128</b>	0.04
<b>Trans-nonaclor</b>	0.16	<b>PCB138</b>	0.04
<b>Cis-nonaclor</b>	0.14	<b>PCB153</b>	0.05
<b>DDE</b>	0.08	<b>PCB156</b>	0.1
<b>DDT</b>	0.03	<b>PCB170</b>	0.05
<b>Mirex</b>	0.1	<b>PCB180</b>	0.05
<b>Heptacloro-epoxido</b>	0.08	<b>PCB183</b>	0.07
<b>PCB28</b>	0.03	<b>PCB187</b>	0.06

11. 6 Anexo VI. Curvas de calibración y cromatogramas del análisis de COPs: a) curva de calibración para PCB-138; b) tiempos de retención para PCBs; c) curva de calibración para DDT; y, d) tiempos de retención para DDT



**11. 7 Anexo VII. Cuadro 10. Contraste de normalidad de Shapiro-Wilk de niveles de COPS y daño al ADN por comunidad.**

Ho: El conjunto de datos sigue una distribución normal

H1: El conjunto de datos no sigue una distribución normal

Variable	Test Shapiro-Wilk	Ho	H1
%DNA in Head	W=,92645, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
%DNA in Tail	W=,93099, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
Tail Length (µm)	W=,92580, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
OTM	W=,87048, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
DDE	W=,70156, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
DDT	W=,37498, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
α_HCH	W=,72676, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
β_HCH	W=,25699, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
γ_HCH	W=,30090, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_28	W=,75673, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_99	W=,30107, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_101	W=,39663, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_118	W=,23769, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_138	W=,17346, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_170	W=,11266, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_183	W=,11266, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCB_187	W=,11266, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
DDTs	W=,11266, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
HCHs	W=,73729, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
PCBs	W=,57371, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
COPs1	W=,55456, p > 0.05	Aceptada	Rechazada
COPs2	W=,74165, p > 0.05	Aceptada	Rechazada