

LISTADO DE ANEXOS INFORME ALTERNO AL COMITÉ SOBRE LOS DERECHOS DEL NIÑO – COLOMBIA 2013¹

ANEXO 1

Listado de Comisarías de Familia en el Oriente Antioqueño de Jurisdicción del Centro Zonal No. 12 del ICBF

ANEXO 2

Sondeo realizado el 12 de febrero del 2014, para verificación del anexo 1 “Listado de Comisarías de Familia en el Oriente Antioqueño de Jurisdicción del Centro Zonal No. 12 del ICBF”

ANEXO 3

Verificación de presencia de Policía de Infancia y Adolescencia en el Oriente Antioqueño

ANEXO 4

Mapa Cartográfico sobre la presencia institucional para el restablecimiento de los derechos de los niños y niñas en el Oriente Antioqueño

ANEXO 5

Relación de Programas y Presupuesto ejecutados en el Departamento de Antioquia por el ICBF en el centro Zonal No. 17 (Oriente Medio) en el año 2013

ANEXO 6

Reporte de visitas para recolección de información relacionada con el informe Alterno por los estudiantes de la Clínica Jurídica UCO

ANEXO 7

Guía de la Organización Mundial de la Salud 2005 (completa) inglés. Disponible en: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf

ANEXO 8

Guía de la Organización Mundial de la Salud 2005 (resumen) versión español. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_spa.pdf?ua=1

ANEXO 9

Resolución 610 de 2010. Regulación calidad del aire en Colombia.

ANEXO 10

Plan de Desarrollo de Medellín 2012-2015. Disponible en: http://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/wpccontent/Sites/Subportal%20del%20Ciudadano/Plan%20de%20Desarrollo/Secciones/Publicaciones/Documentos/PlaDesarrollo2012-2015/2012-06-20_PDM_Sancionado_GacetaOficial.pdf

¹ Los anexos 7, 8, 10, 11 y 12 son muy grandes, por lo cual, en vez de incluirlos en físico, los hemos listado con la dirección electrónica donde pueden ser consultados.

ANEXO 11

Ley 99 de 1993. Establece el Sistema Nacional Ambiental. Disponible en:
<http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=297>

ANEXO 12

Informe oficial de calidad del aire de Medellín – Informe mes de diciembre de 2013.
Disponible en:
<http://www.aredigital.gov.co/CalidadAire/isodocRedAire/Promedio%20mensual%20calidad%20del%20aire%202013.pdf>

ANEXO 13

Informe del proyecto de investigación sobre contaminación y mutagénesis

ANEXO 14

Glosario de contaminantes del aire y el agua (citados en el informe)

ANEXO 15

Tabla comparativa de concentración de contaminantes OMS/EPA/Colombia

ANEXO 16

Artículo científico genotoxicidad sobre linfocitos humanos

ANEXO 17

Artículo científico contaminación por material particulado y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín

ANEXO 18

Artículo científico contaminación atmosférica y salud en niños menores de 5 años

ANEXO 19

Artículo científico interacciones genotóxicas y contaminantes del aire en Medellín

ANEXO 1
LISTADO DE COMISARIAS DE FAMILIA EN EL ORIENTE ANTIOQUEÑO

No.	MUNICIPIO EN QUE OPERA	DIRECCIÓN	TELÉFONO	HORARIO DE ATENCIÓN				NOMBRE (S) DEL (LOS) COMISARIO (S)
				LUN-VIER	SABADO	DOMINGO	FESTIVO	
1	El Carmen de Viboral	Carrera 29 No. 31-46	543 49 52 ext. 108	8 a 12 y 1:30 a 5:30	8 a 12	no	no	Cruz Elena Serna Zuluaga
2	El Peñol	Carrera 18 No. 02-91	851 58 55 Ext. 22	7:30 a 12 y de 1:30 a 6:00	no	no	no	Laura María Duque Aristizábal Móvil 312 834 52 76
3	El Retiro	Calle 20 No. 20-40, Casa de Gobierno	402 54 50 Ext. 134	7:30 a 12 y 1:30 a 5:00	8 a 12	no	no	Nataly Vargas Valencia
4	Guarne	Calle 50 No. 51-71	551 02 93	8 a 12:30 y 2 a 5:30	no	no	no	Marta Lucía Marín Giraldo
5	La Ceja	Casa de Justicia y Paz, carrera 17 entre calles 20 y 21	553 10 40 ext. 119	8 a 11:30 y de 2:30 a 5:30	8 a 11	no	no	Andrea Bedoya Restrepo 314 897 33 58
6	Marinilla	Calle 30 No. 30-13	548 41 01, Ext. 123	7:30 a 12 y de 1:30 a 6				Olga Cecilia Giraldo Arcila
7	Rionegro	Calle 42 No. 61E-32 Urbanización Quintas del Carretero	561 76 88 ó 311 647 65 51	8 a 12:30 y de 2 a 5:00	no	no	no	Ana Cecilia Ospina García
8	Rionegro		3113248961	8 a 12:30 y de 2 a 6:30	no	no	no	Sandra Milena Echeverri Alzate
9	San Vicente	Plazuela Vicente Arbeláez, Palacio Municipal, P-1	854 42 12	7:30 a 12:30 y 1:30 a 4:30	8 a 12	no	no	Lucynés Cardona Ramírez
10	Sonsón	Centro de Convivencia Ciudadana, carrera 8 No. 6-11	869 25 96	Lunes, martes, jueves y viernes de 8 a 12 y 2 a 6	miércoles y sábado de 8 a 2	no	no	Alba Lucía Villa Jaramillo
11	Concepción	Carrera 21 No. 19-23 parque ppal Administración Mpal o alcaldía	856 70 83, Ext. 105	8:00 a 12:00 y 2:00 a 6:00	8:00 a 2:00	9:00 a 11:00	No	Alexandra Gil Aguilar
12	Nariño	Calle 10 No. 13-17 Palacio Municipal	868 01 13 ó 868 00 77 ext 102	8:00 a 12 y 1:30 a 5:30 (Lunes no hay atención)	8:00 a 2:00 jornada continua	8:00 a 2:00 jornada continua	no	ELCIRA RESTREPO CALLE
13	La Unión	Calle 12 No. 11-28, P-2	568 82 10	8:00 a 12:00 y 2:00 a 6:00	8:00 a 1:00	8:00 a 1:00	no	Diego Alejandro Restrepo Mejía

14	Argelia	Carrera 30 No. 30-34 Palacio Municipal.	865 00 77	De 8:00 a 12:00 y 2:00 a 6:00 (lunes de 2 :00 a 6:00).	8 :00 a 12:00 y 2:00 a 6:00	no	no	JOSE ALBEIRO GOMEZ TORO Inspector de Policía y tránsito con funciones de Comisario de Familia
15	Alejandro	Calle 20 No. 19-36, Alcaldía Mpal.	866 01 02 ó 866 00 80 (Directo)	8:00 a 12:00 y 2:00 a 6:00	8:00 a 12:00	no	no	DORA CECILIA JARAMILLO GARCÍA
16	Abejorral	Carrera 50ª No. 50-06	864 72 08 864 70 62 fax	8:00 a 12:00 y de 2:00 a 6:00	8:00 a 1:30	no	no	CAROLINA CARDONA ARANGO
17	Guatapé	Calle 31 No. 30-08	861 05 55	8 a 12 y de 1:00 a 6:00 p.m.	no	no	no	MARIA CLAUDIA VASQUEZ

**ANEXO 2 - SONDEO 12 DE FEBRERO DEL 2014
VERIFICACIÓN DEL ANEXO 1 LISTADO DE LAS COMISARIAS DE FAMILIA DEL ORIENTE
ANTIOQUEÑO**

MUNICIPIO	COMOSARIO(S)	ESTAN EN SU CARGO EN EL MISMO MUNICIPIO	EQUIPO DE TRABAJO	LA VALORACIÓN MEDICA DEL MENOR SE REMITE	EL COMISARIO EJERCE LA FUNCIÓN COMO DEFENSOR DE FAMILIA	HORARIO DE ATENCIÓN LUNES A VIERNES	HORARIO DE ATENCIÓN SABADOS
EL CARMEN DE VIBORAL	OCUPADO						
EL PEÑOL	LAURA MARIA DUQUE ARISTIZÁBAL		TRABAJADOR SOCIAL, PSICOLOGO, SECRETARIA.	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI	LUNES HASTA EL JUEVES 7.30 A 12 Y 1.30 6. V IERNES 7.30 A 12 Y 1.30 A 5	NO
EL RETIRO	NATALI VARGAS VALENCIA	2 AÑOS	TRABAJADOR SOCIAL, PSICOLOGO. AUXILIAR. (SECRETARIA)	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	NO CUENTAN CON UN DEFENSOR DE FAMILIA	7.30 A 12 Y DE 1.30 A 5	8 A 12
GUARNE	MARTA LUCIA MARIN GIRALDO	14 AÑOS	TRABAJADOR SOCIAL, PSICOLOGO. AUXILIAR. (SECRETARIA)	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI	8 A 12 Y DE 1.30 A 5	8 A 12
LA CEJA	MARTA CECILIA CARDONA CARMONA	DESDE JULIO DEL 20013 Y ESTANDO EN EL CARGO 5 AÑOS ATRAS	TRABAJADOR SOCIAL, 2 PSICOLOGOS, TECNICA OPERATIVA. (SECRETARIA)	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO. MEDICO LEGISTA CASA DE JUSTICIA	NO ES DEL ICBF	8 A 11.30 Y 2 A 5.30	NO
MARIILLA	NO CONTESTAN						

ANEXO 2 - SONDEO 12 DE FEBRERO DEL 2014
VERIFICACIÓN DEL ANEXO 1 LISTADO DE LAS COMISARIAS DE FAMILIA DEL ORIENTE
ANTIOQUEÑO

RIONEGRO	NO CONTESTAN						
SAN VICENTE	LUCYINÉS CARDONA RAMIREZ	17 AÑOS	TRABAJADOR SOCIAL, PSICLOGO	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI EN UN TIEMPO SE DESEMPEÑO TAMBIEN COMO INSPECTORA EN SU CARGO DE COMISARIA.	8 A 12 Y 1.30 A 5	8 A 12
SONÓN	ALBA LUCIA VILLA DE BOTERO	14 AÑOS	TRABAJADOR SOCIAL, PSICOLOGO, SECRETARIA	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI	8 A 12 Y DE 2 A 6	MIERCOLES Y SABADO 8 A 12
CONCEPCIÓN	NO CONTESTAN						
NARIÑO	NO CONTESTAN						
LA UNIÓN	DIEGO ALEJANDRO RESTREPO MEJIA	8 AÑOS	TRABAJADOR SOCIAL (PRACTICANTE COMO AUXILIAR) SOLO ESTE AÑO 2014 PSICOLOGO, AUXILIAR (SECRETARIA)	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI	8 A 12 Y DE 2 A 6	8 A 12
ARGELIA	MIRIAN CIELO OSORIO VILLADA	7 AÑOS	SIN EQUIPO DE TRABAJO	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI	DESDE LOS MARTES 8 A 12 Y DE 2 A 6	HASTA EL DOMINGO HASTA LAS 2 PM
ALEJANDRÍA	NO SE ENCONTRABA LA COMISARIA EN EL MOMENTO		SIN SECRETARIA				

ANEXO 2 - SONDEO 12 DE FEBRERO DEL 2014
VERIFICACIÓN DEL ANEXO 1 LISTADO DE LAS COMISARIAS DE FAMILIA DEL ORIENTE
ANTIOQUEÑO

ABEJORRAL	BIBIANA BETANCUR VILLEGAS	15 DIAS.	TRABAJADOR SOCIAL, PSICOLOGO. AUXILIAR. (SECRETARIA). APOYO DE LA POLICIA	AL HOSPITAL DEL MUNICIPIO	SI	8 A 12 Y DE 2 A 6	8 A 1.30
GUATAPE	OCUPADO, NO CONTESTAN						

Verificación de presencia de POLICIA DE INFANCIA Y ADOLESCENCIA en el Oriente Antioqueño

Anexo 3

Circuito	Municipio	Presencia	Persona encargada	Telefono	Acciones que se emprenden para el restablecimiento de derechos de los niños , niñas y adolescentes	Traslado a lugares Remotos	Entidades e instituciones de apoyo.
Rionegro	Rionegro	Central 4 integrantes	Jhonys Elias Espitia Or	3148212466	Se desarrollan actividades de : Prevención, Vigilancia y Control y Responsabilidad penal. Las acciones de restablecimiento de derechos de los N.N.A lo hacen directamente las entidades a las cuales son remitidos los menores por parte de la policia de infancia y adolescencia.	El traslado a zonas remotas de su jurisdicción, solo se realiza cuando se trata de casos de gravedad como : delitos sexuales y homicidio	Secretaria de Familia. Personeria Municipal.Psicólogos MESA de infancia y adolescencia. Secretaria de Salud.
	Jhonys Elias Espitia Ortiz	Guarne	Un encargado				
		Carmen de Viboral	Un encargado				
		San vicente	Un encargado				
		Concepción	Un encargado				
La ceja	La Ceja	Central	Edit Munker	3206492218	Se desarrollan actividades de : Prevención, Vigilancia y Control y Responsabilidad penal. Las acciones de restablecimiento de derechos de los N.N.A lo hacen directamente las entidades a las cuales son remitidos los menores por parte de la policia de infancia y adolescencia.	Cuando hay aprehendido. No van a hacer campañas de prevención.judicialización solo en La Ceja.	ADMN. COMISARIA FAMILIA. SERVO RED (PROGRAMA DE CERO A SIEMPRE).
	Edit Munker	Retiro	Un encargado				
		La Unión	Un encargado				
		Abejorral	Un encargado				
Santuario	Santuario	Central	Jaime Ricardo cepeda	3147184792	Se desarrollan actividades de : Prevención, Vigilancia y Control y Responsabilidad penal. Las acciones de restablecimiento de derechos de los N.N.A lo hacen directamente las entidades a las cuales son remitidos los menores por parte de la policia de infancia y adolescencia.	Actos urgentes , delitos graves . Fiscalia ordena programas metodologicos.	Fiscalia, alcaldia.ICBF. COMISARIA.
	Jaime RicardoCepeda	Cocorna	Un encargado				
		Granada	Un encargado				
		San Francisco	Un encargado				
		San Luis	Un encargado				
		Pto triunfo	Un encargado				

Marinilla	Marinilla	Central	Faber Legarda Rios.			
Faber Legarda Rios.	Guatapé	Un encargado			No realizan como tal el restablecimiento de derechos; lo que realizan es el acompañamiento y se verifica la vulneración, además se trabaja conjuntamente con la comisaria de familia. (esta da la orden de intervención)	Se requiere una orden de servicio que autoriza la principal de Medellín para el traslado a estos municipios. (Plan de marcha)
	San Rafael	Un encargado				
	El Peñol	Un encargado				
	San Carlos	Un encargado				
Sonson	Nariño	Central			Se desarrollan actividades de : Prevención, Vigilancia y Control y Responsabilidad penal. Las acciones de restablecimiento de derechos de los N.N.A lo hacen directamente las entidades a las cuales son remitidos los menores por parte de la policía de infancia y adolescencia.	
	Argelia	Un encargado				
	San Carlos	Un encargado				
	San Vicente	Un encargado				
	Doradal					

Fiscalía de Rionegro para judicialización. Comisarias, secretaría de salud y gobierno.

ANEXO 4





República de Colombia
 Instituto Colombiano de Bienestar Familiar
 Cecilia De la Fuente de Lleras
 Regional Antioquia
 Centro Zonal Oriente Medio
 ANEXO 5



REGIONAL	CENTRO ZONAL	MUNICIPIO	RESPONSABLE	DIRECCION	TELEFONO	SERVICIO	UNIDADES	CUPOS	INVERSION				
		COCORNÁ	GABRIELA LOPEZ	CL 20 23 34	8343414 - 3116483093	HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	16	208	214,876,544				
						DESAYUNOS	71	1558	218,789,940				
						CDI - INSTITUCIONAL SIN ARRIENDO	2	185	410,155,878				
						CDI - INSTITUCIONAL CON ARRIENDO	1	114	271,592,261				
						CDI - MODALIDAD FAMILIAR	1	90	153,232,497				
						HCB -FAMI	11	308	70,139,927				
						DESPLAZADOS HCB			20,565,045				
						DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II		234	34,327,800				
						GENERACIONES CON BIENESTAR	8	200	37,555,000				
						GENERACIONES CON BIENESTAR-RURAL	1	36	12,787,632				
						FAMILIAS CON BIENESTAR	99	297	31,378,248				
						INTERVENCION DE APOYO	1	20	39,788,640				
						HOGARES SUSTITUTOS-VULNERACION	1	2	2,850,378				
						HOGARES SUSTITUTOS-DISCAPACIDAD			8,500,776				
						NNA VICTIMAS DEL CONFLICTO ARMADO			45,574,000				
						TOTAL INVERSION MUNICIPAL							1,572,114,566
						GRANADA	aria Cristina Giraldo Par	CL 20 20 05	20548 EXT: 112 - 3122837	DESAYUNOS	42	983	138,042,690
		CDI - INSTITUCIONAL SIN ARRIENDO	1	195	432,326,466								
		CDI - MODALIDAD FAMILIAR	1	54	91,939,498								
		HCB - FAMI	4	56	25,505,428								
		HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	10	130	134,297,840								
		DESPLAZADOS HCB			10,871,850								
		DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II	116		17,017,200								
		GENERACIONES CON BIENESTAR	8	200	37,555,000								
		FAMILIAS CON BIENESTAR											
		HOGARES SUSTITUTOS-VULNERACION											
		HOGARES SUSTITUTOS-DISCAPACIDAD											
		HOGARES GESTORES-AUTO 006	20	20	80,533,200								
		NNA VICTIMAS DEL CONFLICTO ARMADO			45,574,000								
		TOTAL INVERSION MUNICIPAL							850,000,972				

ANTIOQUIA	Z ORIENTE MEDI	SAN CARLOS	Carlos Hernan Salazar Gira	calle 19 N 18-71	8090 ext 125- 129 - 312285	HCB - FAMI	9	252	57,387,213						
						HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	23	299	308,885,032						
						DESPLAZADOS HCB			24,867,425						
						HOGARES INFANTILES	1	100	192,070,372						
						DESAYUNOS	44	1631	229,041,330						
						HOGAR GESTOR - DISCAPACIDAD	3	3	12,079,980						
						CDI - INSTITUCIONAL CON ARRIENDO	1	65	154,855,236						
						DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II		150	22,005,000						
						MATERNO INFANTIL	1	100							
						GENERACIONES CON BIENESTAR	6	150	28,166,250						
						GENERACION CON BIENESTAR-RURAL	1	60	21,312,720						
						HOGARES GESTORES-AUTO 006	3	3	12,079,980						
						NNA VICTIMAS DEL CONFLICTO ARMADO			94,428,000						
						TOTAL INVERSION MUNICIPAL								1,157,178,538	
						ANTIOQUIA	Z ORIENTE MEDI	SAN FRANCISCO	Ana Patricia Gonzalez Ma	CL 10 11 13	8323030 - 3206672682	HCB - FAMI	5	140	31,881,785
HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	8	104	107,438,272												
DESPLAZADOS HCB			9,937,950												
DESAYUNOS	48	735	103,216,050												
CDI - INSTITUCIONAL SIN ARRIENDO	1	104	230,574,115												
CDI - INSTITUCIONAL CON ARRIENDO	1	0	-												
CDI - MODALIDAD FAMILIAR	0	85	144,719,581												
DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II		116	17,017,200												
INTERVENCIONES DE APOYO	1	28	27,852,048												
GENERACION RURAL CON BIENESTAR	1	24	8,525,088												
FAMILIAS CON BIENESTAR	129	387	40,886,808												
TOTAL INVERSION MUNICIPAL												612,903,168			
ANTIOQUIA	Z ORIENTE MEDI	SAN LUIS	Maria Nury Lopez	KR 19 A 19 22	8348084 - 3104449722							MATERNO INFANTIL	1	40	
												HCB - FAMI	6	84	38,258,142
												HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	19	247	255,165,896
						DESPLAZADOS HCB			19,553,875						
						DESAYUNOS	29	1488	208,959,840						
						HOGAR GESTOR - DISCAPACIDAD	1	1	4,026,660						
						HOGAR GESTOR-OTRAS VICTIMAS	2	2	4,026,660						
						HOGAR GESTOR AUTO 006	2	2	4,708,104						
						CDI - INSTITUCIONAL SIN ARRIENDO	1	65	144,108,822						
						CDI - INSTITUCIONAL CON ARRIENDO	1	52	123,884,189						
						CDI - MODALIDAD FAMILIAR	0	135	229,848,746						
						DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II		264	38,728,800						
						INTERVENCIONES DE APOYO	1	17	33,820,344						
						GENERACIONES CON BIENESTAR	8	200	37,555,000						

						TOTAL INVERSION MUNICIPAL		1,142,645,078	
						HCB - FAMI	13	182	82,892,641
						HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	6	78	80,578,641
						DESPLAZADOS-HCB			13,828,100
						DESAYUNOS	56	1200	168,516,000
						CDI - INSTITUCIONAL SIN ARRIENDO	2	406	900,125,873
						DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II		159	23,325,300
						GENERACIONES CON BIENESTAR	6	150	28,166,250
						GENERACIONES CON BIENESTAR-RURAL	1	71	25,220,052
						FAMILIAS CON BIENESTAR	215	645	68,144,680
						HOGARES SUSTITUTOS	4	8	11,401,512
						HOGAR SUSTITUTO-DISCAPACIDAD	1	1	8,500,776
						TOTAL INVERSION MUNICIPAL			1,410,699,825
						HCB - FAMI	7	364	44,634,499
						HCB - TRADICIONALES FAMILIARES	16	208	214,876,544
						DESPLAZADOS -HCB			17,808,450
						DESAYUNOS	29	2646	371,577,780
						HOGAR GESTOR - DISCAPACIDAD	5	5	20,133,300
						HOGARES GESTORES-HUERFANOS POR LA VIOLENC	21	21	84,559,860
						HOGARES GESTORES-OTRAS VICTIMAS	2	2	4,708,104
						HOGARES SUSTITUTOS VULNERACION	25	184	233,730,996
						RECUPERACION NUTRICIONAL - PAQUETE TIPO I I		2	1,320,080
						RECUPERACION NUTRICIONAL - PAQUETE TIPO ii II		18	10,144,656
						CDI - INSTITUCIONAL SIN ARRIENDO	2	117	259,395,880
						CDI - INSTITUCIONAL CON ARRIENDO	3	228	543,184,521
						CDI - MODALIDAD FAMILIAR	0	173	294,546,911
						GENERACIONES CON BIENESTAR	8	200	37,555,000
						FAMILIAS CON BIENESTAR	209	627	66,242,968
						INTERVENCION DE APOYO-CAPUCHINOS		17	33,831,360
						INTERVENCIONES DE APOYO-ASPERLA			
						DESAYUNOS INFANTILES - TIPO II	471		69,095,700
						TOTAL INVERSION MUNICIPAL			2,307,346,609
						TOTAL INVERSION			9,052,888,756

ANEXO 6 - REPORTE DE VISITAS PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

FECHA	INSTITUCIÓN/ENTIDADVISITADA	MUNICIPIO	NOMBRE DE FUNCIONARIO QUE LE ATENDIÓ	ESTUDIANTE RESPONSABLE	INFORMACIÓN RECOLECTADA
27-08-2013	Bienestar Familiar	Rionegro	Doctora María Teresa en Fiscalía	Marta Lucia García Rendón	<p>En Bienestar Familiar la información fue relativamente poca, la funcionaria refirió que atienden las denuncias, pero que muchas de ellas las remiten para la comisaria de familia y para la fiscalía dependiendo del caso. Las denuncias que corresponde al ICBF después de realizar un seguimiento pertinente, las analizan y toman las decisiones que se consideran más acertadas llegando inclusive a buscar hogares sustitutos a los menores, piensa que una de las principales causas son los hogares o familias disfuncionales.</p> <p>Me remitió a la Comisaria de familia e inspección Municipal que seguramente encontraría mejor información.</p>
27-08-2013	Inspección Municipal y Fiscalía	Rionegro	Inspector Municipal	Marta Lucia García Rendón	Me sugirieron la fiscalía ya que ellos son los competentes con todo lo relacionado menores de edad.
2 de Octubre 2013	ICBF Centro Zonal Oriente N° 12	Rionegro Antioquia	Clara Lucia Ceballos Lara. Trabajadora Social	Alejandra Cristina Orozco Nieto	<p>De los 23 Municipios que se comprende el oriente Antioqueño, solo hay presencia del ICBF en 16 de ellos, abarcándose en su mayoría zonas urbanas, más no rurales.</p> <p>Al igual que nos aportaron una Base de datos de las comisarías de familia en el oriente antioqueño (Anexo1).</p>

2 de Octubre 2013	Alcaldía Municipal	Rionegro	Abogada de Personería: Eliana Ceballos	Mónica Jeannette Henao Suárez	<p>Que programas tiene la personería en las zonas remotas para atender a los niños y niñas que han sido vulnerados sus derechos.</p> <p>La personería se encarga de recibir las denuncias que se ocasionan contra los menores de edad y dirigirlas a la entidad encargada, sea bienestar familiar o comisaría de familia.</p> <p>La personería debe velar por el debido proceso en los casos en los que se ven afectados los menores de edad.</p> <p>La personería es un órgano de control y vigilancia.</p>
2 de octubre de 2013.	Policía de Infancia y adolescencia.	Rionegro.	Patrullera Claudia Marcela Espinosa Betancourt . Grupo de infancia y adolescencia de Antioquia. (Trasladada sede Amaga) .Cel: 3113428667	John Eduer Marín Morales.	<ul style="list-style-type: none"> • Historia y funciones de la Policía de infancia y adolescencia. • Presencia de la policía de infancia y adolescencia a nivel nacional, en el Oriente Antioqueño y lugares remotos
08 de octubre de 2013	Juzgado Promiscuo Primero de Familia	Rionegro	Señor Fredy Echeverry Funcionario del Juzgado	Marta Lucia García Rendón	<p>Se constató que no todos los municipios del Oriente Antioqueño, cuenta con un Juzgado de familia; pues solo existen en los siguientes circuitos:</p> <p>RIONEGRO: Atiende casos de: Alejandría, Concepción, San Vicente, El Carmen, Guarne y Rionegro</p> <p>EL SANTUARIO</p> <p>MARINILLA,</p> <p>LA CEJA y</p> <p>SONSÓN</p> <p>Los casos que llegan a los Juzgados de familia en Rionegro, son muy escasos. Se sugirió consultar en la Comisaria de Familia y en Bienestar Familiar..</p>



**MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y
DESARROLLO TERRITORIAL**

**RESOLUCIÓN NÚMERO
(610)**

24 de marzo de 2010

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

EL MINISTRO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL

En uso de sus facultades legales y en especial las conferidas por los numerales 10, 11 y 14 del artículo 5 de la Ley 99 de 1993, y los artículos 6, 10 y 12 del Decreto 948 de 1995, y

CONSIDERANDO:

Que mediante la Resolución 601 de 2006 de este Ministerio, se establece la Norma de Calidad del Aire o Nivel de Inmisión, para todo el territorio nacional en condiciones de referencia.

Que de conformidad con el concepto técnico de octubre de 2009 y la información recolectada por la Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, se hace necesario realizar ajustes a la Resolución 601 de 2006.

Que en mérito de lo expuesto,

RESUELVE

ARTÍCULO PRIMERO.- Modificar el Anexo 1 de la Resolución 601 de 2006 el cual quedará así:

“Aire: Fluido que forma la atmósfera de la Tierra, constituido por una mezcla gaseosa cuya composición normal es de por lo menos 20% de oxígeno, 77% de nitrógeno y proporciones variables de gases inertes y vapor de agua en relación volumétrica.

Área-Fuente: Es una determinada zona o región, urbana, suburbana o rural, que por albergar múltiples fuentes fijas de emisión, es considerada como un área especialmente generadora de sustancias contaminantes del aire.

Atmósfera: Es la capa gaseosa que rodea a la Tierra.

CO (Monóxido de carbono): Gas inflamable, incoloro e insípido que se produce por la combustión de combustibles fósiles.

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Concentración de una Sustancia en el Aire: Es la relación que existe entre el peso o el volumen de una sustancia y la unidad de volumen de aire en la cual está contenida.

Condiciones de Referencia: Son los valores de temperatura y presión con base en los cuales se fijan las normas de calidad del aire y de las emisiones, que respectivamente equivalen a 25 °C y 760 mm Hg (1 atmósfera de presión).

Contaminación Atmosférica: Es el fenómeno de acumulación o de concentración de contaminantes en el aire.

Contaminantes: Fenómenos físicos o sustancias, o elementos en estado sólido, líquido o gaseoso, causantes de efectos adversos en el medio ambiente, los recursos naturales renovables y la salud humana que, solos o en combinación, o como productos de reacción, se emiten al aire como resultado de actividades humanas, de causas naturales, o de una combinación de éstas.

Emisión: Descarga de una sustancia o elemento al aire, en estado sólido, líquido o gaseoso, o en alguna combinación de estos, provenientes de una fuente fija o móvil.

Episodio o Evento: Es la ocurrencia o acaecimiento de un estado tal de concentración de contaminantes en el aire que, dados sus valores y tiempo de duración o exposición, impone la declaratoria por la autoridad ambiental competente, de alguno de los niveles de contaminación, distinto del normal.

Fuente de Emisión: Actividad, proceso u operación, realizado por los seres humanos, o con su intervención, susceptible de emitir contaminantes al aire.

Fuente Fija: Fuente de emisión situada en un lugar determinado e inamovible, aun cuando la descarga de contaminantes se produzca en forma dispersa.

Fuente Móvil: Es la fuente de emisión que, por razón de su uso o propósito, es susceptible de desplazarse, como los automotores o vehículos de transporte a motor de cualquier naturaleza.

Inmisión: Transferencia de contaminantes de la atmósfera a un “receptor”. Se entiende por inmisión a la acción opuesta a la emisión. Aire inmiscible es el aire respirable a nivel de la troposfera.

Media Móvil: Se calcula del mismo modo que el promedio aritmético para una cantidad n de datos y se va recalculando a medida que se agregan nuevos datos, partiendo del último dato agregado y manteniendo siempre el número de datos correspondiente a la cantidad definida.

NO₂ (Dióxido de Nitrógeno): Gas de color pardo rojizo fuertemente tóxico cuya presencia en el aire de los centros urbanos se debe a la oxidación del nitrógeno atmosférico que se utiliza en los procesos de combustión en los vehículos y fábricas.

Norma de Calidad del Aire o Nivel de Inmisión: Es el nivel de concentración legalmente permisible de sustancias o fenómenos contaminantes presentes en el aire, establecido por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, con el fin de preservar la buena calidad del medio ambiente, los recursos naturales renovables y la salud humana.

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Nivel Normal (Nivel I): Es aquel en que la concentración de contaminantes en el aire y su tiempo de exposición o duración son tales, que no producen efectos nocivos, directos ni indirectos, en el medio ambiente o la salud humana.

Nivel de Prevención (Nivel II): Es aquel que se presenta cuando las concentraciones de los contaminantes en el aire y su tiempo de exposición o duración, causan efectos adversos y manifiestos, aunque leves, en la salud humana o en el medio ambiente tales como irritación de las mucosas, alergias, enfermedades leves de las vías respiratorias o efectos dañinos en las plantas, disminución de la visibilidad u otros efectos nocivos evidentes.

Nivel de Alerta (III): Es aquel que se presenta cuando la concentración de contaminantes en el aire y su duración o tiempo de exposición, puede causar alteraciones manifiestas en el medio ambiente o la salud humana y en especial alteraciones de algunas funciones fisiológicas vitales, enfermedades crónicas en organismos vivos y reducción de la expectativa de vida en la población expuesta.

Nivel de Emergencia (IV): Es aquel que se presenta cuando la concentración de contaminantes en el aire y su tiempo de exposición o duración, puede causar enfermedades agudas o graves u ocasionar la muerte de organismos vivos, y en especial de los seres humanos.

O₃ (Ozono): Gas azul pálido que, en las capas bajas de la atmósfera, se origina como consecuencia de las reacciones entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos (gases compuestos de carbono e hidrógeno principalmente) en presencia de la luz solar.

PST (Partículas Suspendidas Totales): Material particulado que incluye tanto a la fracción inhalable como a las mayores de 10 micras, que no se sedimentan en periodos cortos sino que permanecen suspendidas en el aire debido a su tamaño y densidad.

PM10 (Material Particulado Menor a 10 Micras): Material particulado con un diámetro aerodinámico menor o igual a 10 micrómetros nominales.

PM2.5 (Material Particulado Menor a 2,5 Micras): Material particulado con un diámetro aerodinámico menor o igual a 2,5 micrómetros nominales.

Promedio Aritmético: Es la sumatoria de todos los datos a promediar, dividido por el número total de datos.

Promedio Geométrico: Es la raíz enésima del producto de todos los datos a promediar. Para su cálculo se debe utilizar la siguiente ecuación:

$$G = \sqrt[n]{X1 * X2 * X3 * \dots * Xn}$$

Donde:

G: Promedio Geométrico

X1 * X2 * X3 * * Xn: Datos a promediar

Sistema de Vigilancia de la Calidad del Aire: Conjunto de equipos de medición de calidad del aire instalados sistemáticamente para verificar el cumplimiento de uno o varios de los objetivos de vigilancia de calidad del aire previstos en el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire.

SO₂ (Dióxido de Azufre): Gas incoloro, no inflamable que posee un fuerte olor en altas concentraciones.

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Sustancias Peligrosas: Son aquellas que aisladas o en combinación con otras, por sus características infecciosas, tóxicas, explosivas, corrosivas, inflamables, volátiles, combustibles, radiactivas o reactivas, pueden causar daño a la salud humana, a los recursos naturales renovables o al ambiente.

Tiempo de Exposición: Es el lapso de duración de un episodio o evento de contaminación.”

ARTÍCULO SEGUNDO.- Modificar el Artículo 4 de la Resolución 601 de 2006, el cual quedará así:

“Artículo 4. Niveles Máximos Permisibles para Contaminantes Criterio. En la Tabla 1 se establecen los niveles máximos permisibles a condiciones de referencia para contaminantes criterio, los cuales se calculan con el promedio geométrico para PST y promedio aritmético para los demás contaminantes.

Tabla 1. Niveles máximos permisibles para contaminantes criterio

Contaminante	Nivel Máximo Permissible ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Tiempo de Exposición
PST	100	Anual
	300	24 horas
PM10	50	Anual
	100	24 horas
PM2.5	25	Anual
	50	24 horas
SO ₂	80	Anual
	250	24 horas
	750	3 horas
NO ₂	100	Anual
	150	24 horas
	200	1 hora
O ₃	80	8 horas
	120	1 hora
CO	10.000	8 horas
	40.000	1 hora

Parágrafo Primero: Las autoridades ambientales competentes deberán iniciar la medición de PM2.5, cuando se presente incumplimiento de alguno de los niveles máximos permisibles de PM10. Sin perjuicio de lo anterior, las autoridades ambientales pueden medir PM2.5, de acuerdo con lo establecido en el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire.

Parágrafo Segundo: Las autoridades ambientales competentes que a la fecha de publicación de la presente resolución operen medidores de PST deberán mantenerlos operando siempre que se presente incumplimiento de los niveles máximos permisibles, de acuerdo con lo establecido en el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire.

Parágrafo Tercero: Las autoridades ambientales competentes deben realizar las mediciones de los contaminantes criterio establecidos en el presente artículo, de acuerdo con los procedimientos, frecuencias y metodología establecidas en el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire que adoptará el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Parágrafo Transitorio: Hasta el 31 de diciembre de 2010 el nivel máximo permisible anual de PM10 será de 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y el nivel máximo permisible para 24 horas de PM10 será de 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Los niveles máximos permisibles para PM2.5 empezarán a regir a partir del 1 de enero de 2011.

ARTÍCULO TERCERO.- Modificar el Artículo 5 de la Resolución 601 de 2006, el cual quedara así:

“Artículo 5. Niveles Máximos Permisibles para Contaminantes No Convencionales con Efectos Carcinogénicos y Umbrales para las Principales Sustancias Generadoras de Olores Ofensivos. En la Tabla 2 se establecen los niveles máximos permisibles para contaminantes no convencionales con efectos carcinogénicos y en la Tabla 3 se establecen los umbrales para las principales sustancias generadoras de olores ofensivos.

Tabla 2. Niveles máximos permisibles para contaminantes no convencionales con efectos carcinogénicos

Contaminante No Convencional	Nivel Máximo Permisible ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Tiempo de Exposición
Benceno	5	Anual
Plomo y sus compuestos	0,5	Anual
	1,5	24 horas
Cadmio	5×10^{-3}	Anual
Mercurio inorgánico (vapores)	1	Anual
Tolueno	260	1 semana
	1.000	30 minutos
Vanadio	1	24 horas

Tabla 3. Umbrales para sustancias generadoras de olores ofensivos

Contaminante	Umbral ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Acetaldehído ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)	380
Ácido Butírico ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)	4,0
Amoníaco (NH_3)	35,0
Clorofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}$)	0,1
Dicloruro de azufre (SCl_2)	4,2
Etil mercaptano ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$)	0,5
Etil acrilato ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$)	2,0
Estireno (C_8H_8)	200
Monometil amina (CH_5N)	27,0
Metil mercaptano (CH_3SH)	4,0
Nitrobenceno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	24,0
Propil mercaptano ($\text{C}_3\text{H}_8\text{S}$)	22,0
Butil mercaptano ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{S}$)	3,0
Sulfuro de dimetilo ($\text{C}_2\text{H}_5\text{S}$)	5,0
Sulfuro de hidrógeno (H_2S)	7,0

Parágrafo: Dependiendo de las actividades que se desarrollen en el área de su jurisdicción, las autoridades ambientales competentes deben realizar mediciones, con el fin de identificar las concentraciones de contaminantes no convencionales establecidos en la Tabla 2 y las de aquellas sustancias previstas en la Tabla 3 que generan olores ofensivos.

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Como guía para la autoridad ambiental competente, el Anexo 2 de la presente resolución contiene las actividades y procesos industriales susceptibles de generar contaminantes no convencionales de acuerdo con la Clasificación Industrial Internacional (CIIU) Revisión 3, adaptada para Colombia.”

ARTÍCULO CUARTO.- Modificar el Artículo 6 de la Resolución 601 de 2006, el cual quedará así:

“Artículo 6. Procedimientos de Medición de la Calidad del Aire: El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial adoptará a nivel nacional el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire, el cual será elaborado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) dentro de los seis (6) meses siguientes a la publicación de la presente resolución. Dicho protocolo contendrá las especificaciones generales para la ubicación y el diseño de Sistemas de Vigilancia de la Calidad del Aire, para lo cual tendrá en cuenta las condiciones meteorológicas, geográficas, actividades económicas, infraestructura de transporte, población y en general todos aquellos factores que incidan en la calidad del aire y la salud de las poblaciones; la periodicidad y condiciones para el monitoreo; los recursos necesarios para el montaje, operación y seguimiento de los sistemas de vigilancia de la calidad del aire; el índice nacional de calidad del aire y la definición de indicadores para el monitoreo de la calidad del aire, entre otras. Dicho protocolo será de obligatorio cumplimiento.

Parágrafo Primero: Mientras este Ministerio adopta el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de Calidad del Aire, se seguirán los procedimientos establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA).

Parágrafo Segundo: El Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) adoptará dentro de los seis (6) meses siguientes a la publicación de la presente resolución, los métodos de medición de contaminantes que se deben utilizar para el cumplimiento del Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire. Siempre se deberá utilizar la última versión publicada en la página Web del IDEAM.

Parágrafo Tercero: Mientras el IDEAM adopta los métodos de medición de contaminantes señalados en el parágrafo anterior, se seguirán los métodos establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA).

Parágrafo Cuarto: Las Autoridades Ambientales Regionales, las de Desarrollo Sostenible y las autoridades ambientales a que se refieren el artículo 66 de la ley 99 de 1993 y el artículo 13 de la Ley 768 de 2002 tendrán un plazo máximo de un (1) año, contado a partir de la publicación del acto administrativo que adopte el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire, para diseñar o ajustar los Sistemas de Vigilancia de la Calidad del Aire conforme a los criterios establecidos en el mencionado protocolo.

Se contará con dos (2) años a partir de la publicación del acto administrativo que adopte el Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire para poner en funcionamiento el Sistema de Vigilancia de la Calidad del Aire, conforme a los criterios establecidos en el mencionado protocolo.

Parágrafo Quinto: Con base en la información generada por los Sistemas de Vigilancia de la Calidad del Aire operando de acuerdo con lo establecido en el

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire, las autoridades ambientales deberán elaborar o modificar los Programas de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica que deban implementar.”

ARTÍCULO QUINTO.- Modificar el Artículo 8 de la Resolución 601 de 2006, el cual quedará así:

“Artículo 8. Mediciones de Calidad del Aire por las Autoridades Ambientales. Las autoridades ambientales competentes están obligadas a realizar mediciones de calidad del aire en el área de su jurisdicción, de conformidad con lo establecido en la presente resolución.

Parágrafo Primero: Cuando las concentraciones de contaminantes en el aire puedan generar problemas a la salud de la población, las autoridades ambientales competentes informarán a las autoridades de salud, para que tomen las medidas a que haya lugar. Igualmente, la autoridad ambiental competente deberá contar con los equipos, herramientas y personal necesarios para mantener un monitoreo permanente que le permita determinar el origen de los mismos, diseñar programas de reducción de la contaminación que incluyan las medidas a que haya lugar para minimizar el riesgo sobre la salud de la población expuesta.

Parágrafo Segundo: Las autoridades ambientales competentes están obligadas a informar al público sobre la calidad del aire de todos los parámetros e indicadores establecidos, presentando sus valores, su comparación con los niveles máximos permisibles, su significado y su impacto sobre el ambiente en el área de influencia. Esta información deberá ser difundida por lo menos cada tres (3) meses a través de los medios de comunicación para conocimiento de la opinión pública.

Parágrafo Tercero: Las autoridades ambientales que usen modelos de dispersión de contaminantes deberán basarse en los modelos recomendados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) mientras el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial adopta la Guía Nacional de Modelación de Calidad del Aire.

ARTÍCULO SEXTO.- Modificar el Artículo 10 de la Resolución 601 de 2006, el cual quedará así:

“Artículo 10. Declaración de los Niveles de Prevención, Alerta y Emergencia por Contaminación del Aire. La concentración a condiciones de referencia y el tiempo de exposición bajo los cuales se debe declarar por parte de las autoridades ambientales competentes los estados excepcionales de Prevención, Alerta y Emergencia, se establecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración y tiempo de exposición de los contaminantes para los niveles de prevención, alerta y emergencia

Contaminante	Tiempo de Exposición	Estados Excepcionales		
		Prevención ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Alerta ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Emergencia ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
PST	24 horas	375	625	875
PM10	24 horas	300	400	500
SO ₂	24 horas	500	1.000	1.600
NO ₂	1 hora	400	800	2.000
O ₃	1 hora	350	700	1.000
CO	8 horas	17.000	34.000	46.000

“Por la cual se modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006”

Parágrafo: Cuando en un mismo sitio de monitoreo y en los mismos horarios se estén realizando mediciones de PST y de PM10, prevalecerán las concentraciones de PM10 para declarar los niveles de Prevención, Alerta y Emergencia.”

ARTÍCULO SÉPTIMO.- VIGENCIA. La presente resolución rige a partir de la fecha de su publicación.

PUBLÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá D.C., a los **24 MARZO 2010**

CARLOS COSTA POSADA
Ministro de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Elaboró: C. Rodríguez/A. Valencia
Revisó: C. Buitrago
Fecha: 10/03/10



San Antonio, Texas Noviembre 11 de 2011

PARA: COLCIENCIAS

ASUNTO: INFORME FINAL PROYECTO: ***Origen, Identificación e Interacción de mutágenos presentes en aguas de consumo humano tratadas en las plantas de Ayurá Villa Hermosa y Rionegro.*** CONTRATO 570 - 2003 CÓDIGO 1115-04-14719

Cordial saludo,

A la presente comunicación estamos anexando los productos derivados del proyecto: *Origen, Identificación e Interacción de mutágenos presentes en aguas de consumo humano tratadas en las plantas de Ayurá Villa Hermosa y Rionegro.* Igualmente se incluye el correspondiente informe financiero.

Agradeciendo la atención prestada,

Carlos Peláez

Profesor Instituto de Química

Universidad de Antioquia.

Producto 1. Artículo

Potencialidad Mutagénica y Genotóxica de Aguas que Surten una Planta de Potabilización.

José Fernando Oñate Garzón¹, Ary Fabián Paruma Velasco¹, Héctor Hugo Cárdenas Pérez¹, Iván Meléndez¹, Margarita Zuleta Bustamante†¹, Carlos Alberto Peláez²

¹Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, Universidad de Antioquia.

²Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM), Universidad de Antioquia.

Resumen

La genotoxicidad y mutagenicidad del agua en afluentes de la planta de potabilización "Ayurá", fue evaluada mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos y el test de Ames respectivamente. Los resultados mostraron que tanto la mutagenicidad como la genotoxicidad de estas aguas que están influenciadas por desechos urbanos, tenían efecto estadísticamente significativo ($p < 0.01$), con respecto al control negativo. Aguas con estas características generalmente contienen diferentes concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), aminas heterocíclicas (AHs) y nitrosaminas. Para el efecto mutagénico, la presencia de mutágenos que actúan por pérdida y ganancia de bases fue mayor que los que actúan por sustitución de bases ($p < 0.01$), en ambos sitios muestreados. Los extractos orgánicos acuosos, se concentraron utilizando resinas XAD2 y XAD7. Se detectó actividad mutagénica más que todo por pérdida y ganancia de bases en presencia de S9.

En este estudio se utilizó el ensayo cometa para investigar la genotoxicidad causada por concentraciones de material orgánico en fuentes de agua de consumo, como la quebrada las Palmas y el agua antes de ser tratada en una planta. Los resultados del ensayo cometa mostraron que todas las concentraciones de extracto de las muestras de agua, pueden inducir diferentes niveles de daño en el ADN en linfocitos humanos y también se observó una diferencia significativa estadísticamente ($p < 0.01$) de los tratamientos con respecto al control negativo.

Los resultados sugieren que los contaminantes presentes en estas fuentes de agua de consumo, son potencialmente peligrosos para la salud humana.

Palabras claves: Mutagenicidad, Genotoxicidad, Aguas negras, Test de Ames, Ensayo cometa.

Mutagenic and Genotoxic Potential of the Raw Water of the Treatment Plant and theirs Affluents.

Abstract.

The mutagenicity and genotoxicity of the raw water of a treatment plant and their affluent, was observed throughout Ames test and comet assay. These results indicate that the positive mutagenic and genotoxic effect of those waters ($p < 0.01$), is due to the presence of pollutants arise come from urban's and restaurant's discharges. The raw waters with those features, are generally constituid by pollutants such as: Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAH), Heterocyclic Amines (HA) and Nitrosamines. The kind of mutation most observed in both sites was for frameshift mutation in presence of metabolic action (S9). The organic aquous extracts were obtained from column glass with Amberlite® XAD2 y XAD7 resins.

On the other hand, the comet assay has been used in this work in order to detrminate the genotoxic effect of the aquous extracts of the Palmas stream's water and the raw water of the treatment plant. The results of the comet assay shown that the all concentrations of the aquous extracts, are able of generate different type of damage on DNA in human lymphocytes. Therefore, also was observed a significative difference ($p < 0.05$) among the treatments with respect to the negative control.

Keywords: Mutagenicity, Genotoxicity, Raw water, Ames test, Comet assay.

1. Introducción.

Un ambiente acuático, como un río, es un depositario de descargas antropogénicas, domésticas, agrícolas e industriales, constituyéndose así en reservorios potenciales de mutágenos. Estos ríos pueden ser utilizados como fuente de agua potable (Kataoka et al., 2000). Muchos estudios han revelado que las aguas superficiales pueden contaminarse con genotóxicos a través de diferentes fuentes como desechos industriales, aguas negras, lixiviados agrícolas con agroquímicos (Ohe, 1997; Shen et al., 2003). Consecuentemente la contaminación del agua puede ser un serio problema para la salud humana y un riesgo para el ecosistema acuático. Muchos estudios a nivel mundial han determinado que las aguas de los ríos contaminados presentan propiedades genotóxicas y mutagénicas (Ohe et al., 2003), debido a los compuestos

tales como las aminas heterocíclicas (AHs) (Ohe, 1997), formadas en las partes quemadas de carnes fritas y asadas, que pueden llegar al agua por la orina y heces fecales (Ushiyama et al., 1991; Sousa et al., 1995); hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) formados por la combustión incompleta del material orgánico (Marston et al 2001; Yang et al 2003), entre otros desechos (Kleinsasser et al., 2000; Vargas et al., 2001).

Una planta de potabilización, ubicada al suroriente de Medellín (Colombia), que distribuye agua potable a más de 1.500.000 habitantes de la parte sur de Medellín y municipios aledaños, potabiliza agua procedente de la represa La Fe, la cual se abastece de las quebradas Las Palmas y otros ríos que pueden estar contaminados con agroquímicos, desechos industriales y aguas negras domiciliarias. La quebrada Las Palmas, además, recibe aguas negras provenientes del corregimiento de Las Palmas, de algunas veredas y de expendio de carnes fritas y asadas, así como de carpinterías, ricas en solventes y bombas de gasolina.

El ensayo de mutagéncidad de Ames, que consiste en cepas de *Salmonella typhimurium* con mutación en el operón histidina, determinan si algún compuesto o mezcla es mutagénica o no, dependiendo de la cantidad de colonias revertantes de his- a his+. Este ensayo, ha sido ampliamente usado para detectar actividad mutagénica en mezclas complejas ambientales, así como de agua de río. Cepas altamente sensibles responden a aminas aromáticas y/o nitrocompuestos que también han sido encontrados ambientalmente en algunas aguas superficiales (Kusamran et al., 1994; Kataoka et al., 2000; Goto et al., 2000).

No existen muchos estudios de genotoxicidad en aguas evaluadas mediante el ensayo Cometa, por lo tanto, es de gran importancia evaluar la genotoxicidad del extracto del agua de Las Palmas y de la Planta La Ayurá en linfocitos humanos, ya que permite observar si hay interacción de estos mutágenos con el ADN de células humanas.

Hasta la fecha, en Colombia, no hay reporte de estudios de genotoxicidad y mutagéncidad de estas aguas, pero si se han realizado estudios de mutagénesis e identificación de mutágenos en aguas de río Rionegro y su respectiva planta, y en la Planta de Villa Hermosa, trabajos realizados por el Grupo de Mutagénesis Ambiental de la Universidad de Antioquia.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestras

Las muestras de agua fueron colectadas en la quebrada Las Palmas y en una planta de tratamiento de aguas pero antes de tratar, de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1995). 100 litros de agua fueron tomados en la quebrada Las Palma a 1 metro de profundidad, mientras que los 100 litros de agua antes de tratar, se tomó en el laboratorio de la planta de tratamiento de agua. Ambas muestras se tomaron en 3 ocasiones distintas con igualdad de condiciones. Posteriormente los 100 litros de agua de cada uno de los sitios muestreados se pasaron por un filtro de gasa con el fin de retener cualquier material sólido.

2.2. Extracción del material orgánico

Se pasaron los 100L de cada muestra por columnas de vidrio constituidas por 100g de resinas Amberlita® XAD2 y XAD7. El agua se pasó por gravedad, a una velocidad de 15mL/min. El material orgánico de la columna fue consecutivamente eluido con 300mL de: acetona (CH_3COCH_3), dietil éter ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$) y metanol (CH_3OH), a una velocidad de 15mL/min. Cada solvente fue evaporado hasta ser secado, con una rotaevaporador a 55°C y una bomba de vacío.

2.3 Mutagenicidad por el test de Ames

La mutagenicidad de las dos muestras de agua fueron evaluadas mediante el ensayo de reversión de *Salmonella* (auxotrofas de histidina) con cepas TA98 y TA100, de acuerdo al procedimiento descrito por Ames et al., 1973 y revisado por Maron y Ames (1983). Las muestras fueron analizadas con y sin fracción hepática S9, el cual incorpora un importante aspecto del metabolismo mamífero dentro del test *in vitro*. Los extractos acuosos de las muestras fueron evaluados en platos por duplicado en tres experimentos independientes. 6 dosis de extracto fueron evaluados: 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 y 3 mg/mL DMSO (50%). El control negativo utilizado fue DMSO (50%) y el control positivo fue 2 aminofluoreno (1µg/mL).

2.4. Evaluación de la genotoxicidad mediante el ensayo Cometa.

La muestra de sangre fue colectada de un voluntario (saludable, no fumador, de 22 años de edad) en vacuntainer estéril con heparina como anticoagulante. Los linfocitos fueron aislados de las muestras de sangre a base de ficoll, mediante centrifugación a 2000rpm por 30'. Fueron lavados con PBS y tratados independientemente a distintas dosis: 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5 mg/mL DMSO (1%). Las células fueron rutinariamente chequeadas por viabilidad celular mediante azul de tripan, antes y después de tratamiento. La viabilidad de células tratadas fue en promedio alrededor del 85%.

Posteriormente el ensayo cometa fue llevado a cabo y se procesó según la metodología propuesta por Singh et al., (1988). Las células tratadas, mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5%, se pipetearon sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (NMA), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca, por mínimo una hora. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH >13) (NaOH 10N y EDTA 200mM) a 4°C por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las rupturas de los sitiosapurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V, 300mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio. Las células se observaron de manera manual (Rajaguru et al., 2002; Li Yi-qiang et al., 2006) en un microscopio marca Nikon con un filtro verde de una longitud de onda de 540nm, con un aumento de 400X y un micrómetro ocular de 20X con un valor máximo de medición de 100µm. Se hicieron tres experimentos independientes y se analizaron 100 células por cada tratamiento (50 células por placa) (Rajaguru et al., 2002). El daño del ADN se midió con base en la longitud en µm de la migración de los fragmentos de ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola, hay más fraccionamiento del ADN) (Maluf and Erktmann, 2000; Zang et al., 2000; Hartmann et al., 2001; Zhong et al., 2001; Kamer y Rinkevich, 2002; Hartmann et al., 2003). Para medir el daño también se tiene en cuenta la frecuencia de células dañadas. Los linfocitos, cuyas colas sean mayores a dos veces la longitud promedio del control, se clasificaron como células dañadas.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados del test de Ames se analizaron mediante la variable de índice mutagénico (IM), que significa la cantidad de revertantes inducidas por el tratamiento sobre las revertantes espontáneas. El análisis se hizo mediante pruebas no paramétricas de Mann Whitney, análisis de correlación de Spearman y regresión lineal. Para los datos de genotoxicidad se realizó la prueba de viabilidad celular, y en el ensayo cometa solo se tomó el parámetro de (longitud de cola en μm) por que la lectura se hizo manual según (Rajaguru et al., 2002), se promediaron (medianas) con base en los datos de 50 células por cultivo de linfocitos (unidad experimental) y el análisis se llevó a cabo mediante regresión lineal. Se utilizó el programa estadístico SPSS, con un nivel de significancia máximo de 0,05.

3. Resultados

3.1. Ensayo de Salmonella.

En la Tabla 1 se resumen los resultados promedio (Media y desviación estándar) de Mutagenicidad (IM) obtenidos en el test de Ames, para cada uno de los cuatro factores incluidos en el estudio (sitio, cepa, activación metabólica y dosis de extracto).

El factor Sitio (Palmas y planta La Ayurá), influye significativamente en el IM con respecto al control ($p < 0.01$), con base en prueba no paramétrica; no obstante, el incremento promedio de la planta La Ayurá, respecto de Palmas, es solo del 12%.

El factor Cepa (TA-98 y TA-100) y el Factor Activación Metabólica (Con S9 y Sin S9), influyen significativamente en el IM con respecto al control ($p < 0.01$), con base en prueba no paramétrica; el incremento promedio de la Cepa TA-98 respecto a la Cepa TA-100 es del 70% y el incremento promedio de la Activación Metabólica Con S9 respecto a Sin S9, es del 77%.

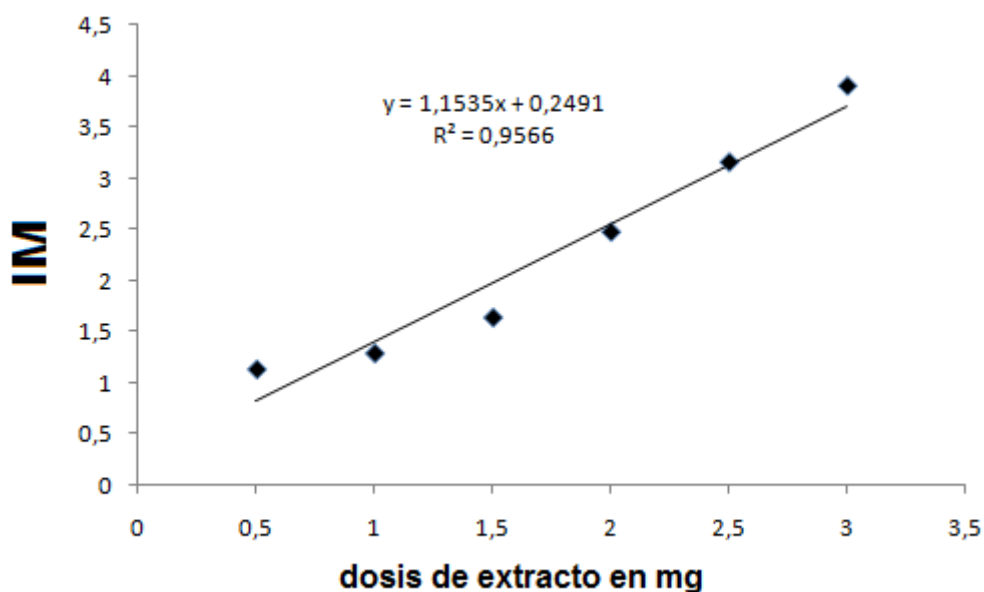
El factor dosis influyó significativamente en el IM con respecto al control ($p < 0.01$) con base en la prueba de correlación de Spearman y el IM incrementa dependiendo directamente de la dosis mostrando así, mayor promedio de IM en la mayor dosis (3mg/mL) y el menor promedio de IM lo tiene la menor dosis (0.5mg/mL).

TABLA 1. Índice de Mutación registrado en dos Sitios (Palmas y planta La Ayurá), con dos Cepa (TA-98 y TA-100), y Con y Sin Activación Metabólica para siete Concentraciones

Índice de Mutación				
FACTORES		*X ± EE	N	p = significancia estadística
SITIO	Palmas	2.029 ± 0.074	168	U = 11742.000 ^a p = 0.007
	Planta La Ayurá	2.145 ± 0.074	168	
CEPA	TA-98	2.622 ± 0.074	168	U = 10682.500 ^a p = 0.000
	TA-100	1.552 ± 0.074	168	
ACTIVACIÓN METABÓLICA	CON S-9	2.671 ± 0.074	168	U = 9422.000 ^a p = 0.000
	SIN S-9	1.503 ± 0.074	168	
DOSIS DE EXTRACTO EN mg/mL	0.5	1.140 ± 0.037	56	Rho = 0.825 ^b p = 0.000
	1	1.296 ± 0.037	56	
	1.5	1.644 ± 0.037	56	
	2	2.476 ± 0.037	56	
	2.5	3.154 ± 0.037	56	
	3	3.896 ± 0.037	56	

*Media más o menos error estándar

Mediante la prueba no paramétrica de correlación de Spearman, se identificó asociación lineal positiva, significativa estadísticamente ($p < 0.01$), entre las dosis del extracto y el IM (tabla 1). En la Figura 1 se observa el análisis de regresión, la cual indica que la dosis es directamente proporcional al IM. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.95$) permite inferir que la variabilidad observada en el índice de mutación depende en un 95% de la concentración de los extractos acuosos. El 5% restante, posiblemente depende de otros factores tales como el sitio de muestreo, de la cepa y de la activación metabólica.

FIGURA 1. Asociación lineal positiva entre dosis de extracto en mg/mL e índice mutagénico (IM).

Las combinaciones más mutagénicas se dieron en la cepa TA98, con S9 combinadas con la concentración más alta del extracto (3mg); en las cuales se registró un IM de 7 a 8 veces mayor que el registrado en el control negativo, tanto para planta La Ayurá como para Las Palmas. Las combinaciones menos mutagénicas fueron Cepa TA-100 Sin S9 con las concentraciones 1.5 y 0.5 mg de extracto, tanto para Palmas como para la planta La Ayurá (tabla 2).

TABLA 2. Estadísticos descriptivos. Variable dependiente: **Índice de mutación.**

Cepa, Sitio y activación metabólica (S9)	Dosis mg/mL	Media	Desv.típ.	N
Quebrada Las Palmas, Cepa TA98 Con S9	3.00	8.203	0.52	6
Planta "A", Cepa TA98 Con S9	3.00	7.335	0.175	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA98 Con S9	2.50	6.515	1.06	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA98 Con S9	2.00	5.678	0.7287	6
Planta "A", Cepa TA98 Con S9	2.50	5.308	0.36	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA100 Sin S9	0.5	1.023	0.063	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA100 Sin S9	1	1.05	0.030	6
Planta "A", Cepa TA98 Con S9	0.5	1.063	0.739	6
Quebrada Las Palmas, Cepa TA100 Sin S9	1.5	1.093	0.093	6
Planta "A", Cepa TA100 Sin S9	0.5	1.12	0.043	6

3.2. Ensayo Cometa.

En la tabla 3, Se resume el efecto genotóxico inducido en linfocitos humanos por el extracto de agua de dos sitios (Palmas y planta La Ayurá), evaluado mediante el ensayo Cometa. El biomarcador de genotoxicidad es la “longitud de cola” en μm .

TABLA 3. Longitud de cola inducida por dosis, sitio de muestreo e interacción entre dosis y sitio de muestreo.

Dosis (mg)	Longitud de cola X (μm) \pm e. e *	
	Palmas	Planta La Ayurá
DMSO	31.150 \pm 2.773	32.89 \pm 2.773
0.5	48.92 \pm 2.773	46.527 \pm 2.773
0.75	57.97 \pm 2.773	54.277 \pm 2.773
1	59.527 \pm 2.773	58.527 \pm 2.773
1.25	69.980 \pm 2.773	64.623 \pm 2.773
1.5	75.797 \pm 2.773	68.127 \pm 2.773

* Media \pm error estándar (Tamaño de muestra)

Mediante análisis de correlación y regresión se identificó una asociación lineal positiva, significativa estadísticamente (Palmas: $r^2 = 0.98$, $p < 0.05$; planta La Ayurá: $r^2 = 0.98$, $p < 0.05$) entre las dosis de los extractos y la longitud de cola de las 300 células medidas por cada dosis (ver figura 2). El coeficiente de determinación (r^2) permite inferir que la variabilidad de la longitud de cola depende en un 98% de la concentración del extracto, en ambos sitios. Se logra observar una diferencia entre los dos sitios puesto que las pendientes difieren en un 18.55% entre sí.

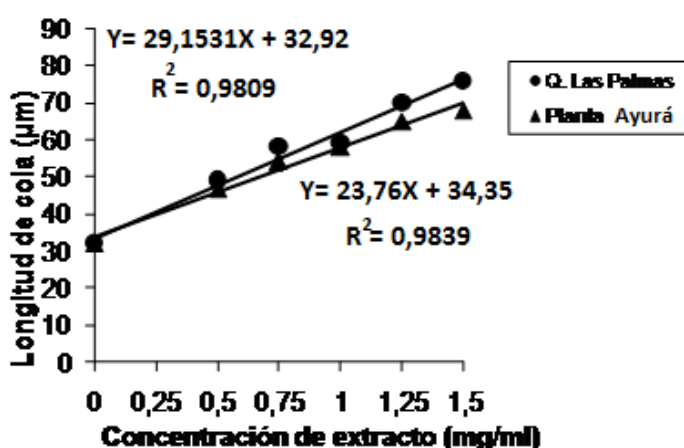


FIGURA 2. Asociación lineal positiva entre longitud de cola y dosis (mg/mL) de extracto de dos sitios de muestreo: Las Palmas y planta La Ayurá, promediado a partir de 300 datos por cada dosis.

En la tabla 4 y figuras 3 y 4, se presenta la viabilidad celular (%) y el porcentaje de células dañadas (son las células con longitud de cola mayor al promedio del control), registradas en 300 células por dosis, en cada sitio.

Se logra observar que a medida que incrementan las dosis disminuye la viabilidad de las células en los extractos. Sin embargo, la viabilidad no sobrepasa el 50%, lo que sugiere, que este porcentaje de células pueden estar acumulando daño y en consecuencia, presentar alteraciones en la fisiología celular

TABLA 4. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de daño inducido por los extractos de Las Palmas y de la planta La Ayurá a las diferentes dosis evaluadas.

Sitio	Dosis (mg/mL)	% Viabilidad post-tratamiento	% de daño
Palmas	DMSO	96	16
	0.5	82	65
	0.75	85	82
	1	80	94
	1.25	86	90
	1.5	77	99
	Planta La Ayurá	DMSO	95
0.5		89	50
0.75		80	58
1		87	70
1.25		80	83
1.5		75	94

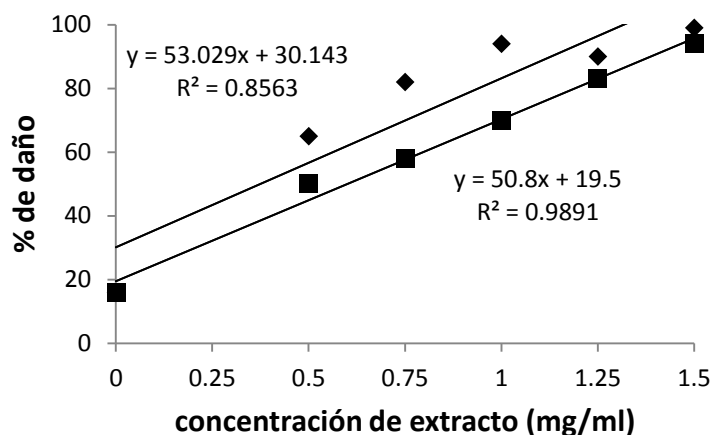


FIGURA 3. Porcentaje de linfocitos humanos dañados, expuestos una hora a seis dosis de extracto de la quebrada Las Palmas (◆) y de agua cruda al entrar a la planta La Ayurá (■).

La viabilidad de los linfocitos humanos pre - tratamiento osciló entre 90 y 99%, y mientras que post-tratamiento disminuyó en ambos sitios entre 96% y 75% en forma dosis dependiente, después de incubarlos por una hora con las diferentes concentraciones de los dos extractos de agua.

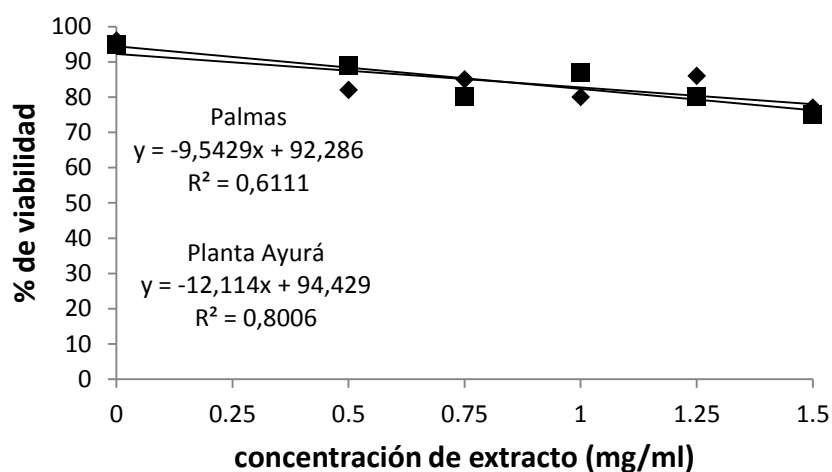


FIGURA 4. Viabilidad de linfocitos humanos después de una hora de tratamiento con seis dosis de extracto de Las Palmas (◆) y de agua cruda al entrar a la planta La Ayurá (■) medido mediante coloración con azul de tripano.

4. Discusión.

Los estudios nacionales e internacionales sobre mutágenos en cuerpos de aguas contaminadas con residuos industriales, agroquímicos y aguas negras demuestran que hay un incremento en el IM y la longitud de cola (Meléndez et al., 2001; Ohe et al., 2003; Zuleta et al., 2004; Umbuzeiro et al., 2004; Mathur et al., 2005; Cardozo, 2006), concordando con este estudio, que identificó un incremento, respecto del control, en el número de revertantes en las cepas TA 98 y TA 100 de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica y en la longitud de cola de linfocitos humanos, expuestos a las diferentes dosis de aguas contaminadas de la quebrada Las Palmas y agua cruda que entra a la planta La Ayurá.

El incremento de IM en presencia de S9, en las cepas evaluadas, indican que estas aguas se encuentran influenciadas por desechos de zonas urbanas, zonas agrícolas e industriales (carpintería y bombas de gasolina) que contienen mutágenos, en su mayoría indirectos, que necesitan activación metabólica para inducir mutación por pérdida o ganancia de bases (TA 98) y sustitución de bases (TA100).

El agua de la planta La Ayurá, mostró mayor efecto mutagénico que el agua de la quebrada Las Palmas. Este incremento en la mutagenicidad puede ser debido a que en la planta La Ayurá se acumulan los mutágenos provenientes de las Palmas y otros afluentes. Según Vargas et al., 2001, muchos de estos compuestos son transportados en el agua conservando sus características físicas y químicas.

La mayor actividad mutagénica observada en los sitios analizados, fue de acción indirecta en presencia de activación metabólica. Esto indica que en estas aguas hay mayor concentración de mutágenos indirectos ó sea que necesitan ser metabolizados para activarse y así poder interactuar con el ADN. Entre estos compuestos, los más comunes que se han encontrado en estudios similares son: aminas heterocíclicas (Zuleta et al., 2004), hidrocarburos policíclicos aromáticos (Cardozzo et al., 2006) y nitrosaminas (Mitch et al., 2003). Un posible mecanismo para que estos compuestos se activen es por dos procesos: El primer proceso es llevado a cabo por citocromo p450 (CYP1A2) y el segundo es llevado a cabo por o-acetyltransferasa y

sulfotransferasa, ocasionando así especies altamente reactivas capaces de unirse al ADN (McManus et al., 1990; Tureky et al., 1991; Boobis et al., 1996; Sugimura, 2000).

En este trabajo la mayor actividad mutagénica fue observada con la cepa TA98 la cual detecta mutágenos cuyo proceso molecular conduce a la mutación por pérdida y ganancia de bases. Muy posiblemente esta alta actividad sea debido a las aminas heterocíclicas, ya que son mutágenos indirectos (Zhu et al., 2000) que inducen mutación por pérdida o ganancia de bases, formadas en la costra quemada de alimentos proteicos fritos y asados (Pfau et al., 2006), pueden llegar a estas aguas por medio de la orina y heces fecales de las personas que las consumen (Ushiyama et al., 1991). Las aminas más abundantes encontradas en los cuerpos de agua que presentan este tipo de contaminación son las arilaminas, que son compuestos altamente mutagénicos y eventualmente carcinogénicos (IARC, 1975), se encuentran generalmente en desechos industriales; que en el caso de la planta La Ayurá y Palmas, vienen en desechos de colorantes usados en la carpintería. Algunos colorantes, cuando son descargados dentro del río, pueden permanecer suspendidos en el agua (Garrison y Hill, 1972; Maguire y Tracz, 1991) ó pueden ser absorbidos por el botón de sedimentos o bioconcentrados (Umbuzeiro et al., 2004). Algunos estudios han relacionado la actividad mutagénica de los ríos con la presencia de aminas aromáticas (Ono et al., 2000; Zuleta et al., 2004).

Esta actividad mutagénica también podría deberse a la presencia de otros compuestos tales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), que provocan mutación por pérdida o ganancia de bases, son aportados también por la contaminación (Granella et al., 1995; Hakura et al., 2003), son formados por la combustión incompleta de material orgánico (Yang et al., 2003) y pueden llegar a estas aguas por desechos industriales, residuos domiciliarios, lluvias, escorrentías o procesos atmosféricos (Urano, 1998; Zuleta et al., 2004; Cardozo et al., 2006). El benzo a pireno es uno de los HPA más comunes a nivel ambiental, ya sea libre o en mezcla compleja (White, 2002) y por lo tanto uno de los más estudiados (De Marini et al., 1994). El mecanismo de acción del benzo- a -pireno en la cepa TA 98 ha sido determinado (Bell et al., 1991; De Marini et al., 1993; Levine, 1994) y consiste en una mutación inducida en un punto caliente consistente en la delección de bases (CG ó GC) en la secuencia CGCGCGCG.

En aguas negras, a nivel mundial, se han encontrado otros tipos de mutágenos tales como los pthalatos y benzotriazoles. Los benzotriazoles son compuestos mutagénicos que actúan por mutación de pérdida o ganancia de bases (Fracasso et al., 1999) y pueden llegar a los ríos por desechos industriales (Onodera et al., 1991). Los benzotriazoles son mutágenos indirectos de origen industrial que inducen revertantes más que todo en la TA98 (Nukaya et al., 1997; Shiozawa et al., 2000; Nukaya et al., 2001; Watanabe et al., 2002).

La baja actividad mutagénica de la cepa TA100 con y sin activación metabólica, en comparación con la TA98, tanto en la quebrada Las Palmas como en la planta La Ayurá, puede ser atribuido a varios procesos de interacción entre metabolitos y blancos genéticos en la cepa TA100 (HisG46, G-C) (Levin et al., 1982). Las aguas evaluadas, son alimentadas principalmente con desechos domiciliarios y no han sido sometidas a procesos de cloración, por lo tanto no hay productos de cloración como trihalometanos y furanonas, que son fuertes mutágenos en la cepa TA100 (Sujbert et al., 2006). Otra razón puede ser que en las aguas estudiadas hayan muy bajas concentraciones de nitrosaminas que son mutágenos indirectos (Yamasaki et al., 1992; Lijinsky et al., 1999) que actúan por sustitución de bases (Prival et al., 1983; Guttenplan, 1987; Cooper and Porter, 2000) y sus concentraciones incrementan después de la cloración (Mitch and Sedlak, 2002).

En esta investigación se identificó una relación dosis-efecto entre las concentraciones de los extractos acuosos de ambos sitios y los marcadores de mutagenicidad (IM) y daño genético (Longitud de cola). Según DeMarini (1991), la asociación lineal positiva entre las dosis y los biomarcadores de mutagenicidad y genotoxicidad puede deberse a la aditividad entre compuestos intrínsecos de cada extracto (mezclas complejas), que expresa las sumas de las respuestas mutagénicas con respecto al incremento proporcional de la dosis. Además, Taylor y colaboradores (1995), afirmaron que las interacciones entre dos mutágenos similares no tienden a reaccionar entre si por sus características electrofílicas, sino que reaccionan con otras moléculas presentes en el extracto, macromoléculas celulares ó de la mezcla S9. Por lo tanto, contando solo con pruebas mutagénicas y genotóxicas, no es posible predecir el efecto aditivo, sinergismo o antagonismo de varios químicos en sistemas biológicos.

Los resultados del ensayo cometa, demuestran que los extractos acuosos de Las Palmas y de la planta La Ayurá, inducen diferentes niveles de daño del ADN en linfocitos humanos. Esto se debe posiblemente a que en esta agua están presentes mutágenos tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas y nitrosaminas, que forman aductos con el ADN (Koeda et al., 1978; Shamsudin et al., 1988; Ohe, 1997; Garry et al., 2003), ocasionando así sitios apurínicos, permitiendo su fragmentación e incremento de cola (Ashby et al., 1995; Vaghef et al., 1996; Speit et al., 1996; Sasaki et al., 1997).

Con respecto a la genotoxicidad los dos sitios (Palmas y planta La Ayurá), presentaron diferencia entre pendientes, lo que indica que el extracto de la quebrada Las Palmas indujo una genotoxicidad ligeramente mayor que el de la planta La Ayurá. Las aguas que llegan a la planta La Ayurá, han estado previamente almacenadas en una represa, permitiendo por lo tanto la sedimentación de muchos mutágenos ya sea en forma libre o unidos al material orgánico (ácidos húmicos y fúlvicos) impidiendo así su transporte a la planta La Ayurá (Guzella y Sora, 19987; Kutlu et al., 2004). Muchos de estos compuestos sedimentados alcanzan condiciones afóticas, disminuyendo así su potencial genotóxico (Duque et al., en proceso de publicación). Además según Ramírez et al., 2005, en esta represa se ha encontrado gran cantidad de material orgánico y diversidad de microorganismos, por lo tanto pueden interactuar entre sí complejamente y transformar compuestos genotóxicos en no genotóxicos (Rand and Petrocelli, 1985; Reifferscheid et al., 1991).

La viabilidad celular post-tratamiento disminuye con respecto a la viabilidad celular pre-tratamiento. Este efecto puede deberse a que ciertos compuestos tales como los HPAs, disminuyen la viabilidad celular en varios tipos de células (Geary et al., 1996; Myllynen et al., 2007).

Conclusión

Con los resultados, se puede concluir que las aguas que llegan a la planta La Ayurá contienen mutágenos en su gran mayoría, aquellos que inducen pérdida o ganancia de bases en el ADN, y que además necesitan activación metabólica para su acción. De acuerdo a la literatura estos compuestos podrían ser hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas, ptalatos, y benzotriazoles, que han mostrado por diversos estudios características tan similares a las

mencionadas y que por las prácticas agrícolas, el estilo de vida y los procesos industriales de esta región sería muy posible encontrarlos en las aguas estudiadas.

Por lo tanto los compuestos que constituyen estas aguas tienen la capacidad de interactuar con el ADN en linfocitos humanos, lo que indica que muchos de estos compuestos son peligrosos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a COLCIENCIAS, EPM, Aguas de Rionegro, CORNARE, Universidad de Antioquia. A los que con su aporte colaboraron con el desarrollo del mismo, Armando Arenas, Robinsón Pulgarín.

Bibliografía

- Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A) (1973). 70, 782-786.
- Ashby, J. Tinwell, H., Lefevre, P.A., Browne, M.A., Mutagenesis 1995. 10, 85.
- Baisch, P., Les oligo-elements metalliques du systeme fluvio lagunaire Dos Patos (Brésil). Flux et Devenir, Doctoral thesis, L' Universite de Bordeaux I. Bordeaux. 1994.
- Bell, D.A., Levine, J.G., and DeMarini, D.M., DNA sequence analysis of revertants of the hisD3052 allele of *Salmonella typhimurium* TA98 using the polymerase chain reaction and direct sequencing: application to 1-nitro-pyrene- induced revertants. Mutat. Res 1991. 252, 35-44.
- Boobis, A.R., Gooderham, N.J., Edwards, R.J., Murray, S., Lynch, A.M., Yadollahi-Farsani, M., Davies, D.S., Enzymes and interindividual differences in the metabolism of heterocyclic amines. Arch. Toxicol 1996. 18, 286-302.
- Cardozo. T. R., Rosa. D. P., Feiden. I. R., Rocha. J. A., Avila de Oliveira. N. C., Pereira. T. S., et al., Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. Mutation Research 2006. 603: 83-96.
- Cooper, M.T and Porter, T.D., Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase – deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome p450 2E1 and reductase. Mutat. Res 2000. 452, 45-52.
- DeMarini, D.M., Bell, D.A., Levine, M.L., Shelton, M.L and Alu-Shakra. A., Molecular analysis of mutation induced at the hisD3052 allele of *Salmonella* by single chemicals and complex mixtures. Environ. Health. Perspect 1993. 101 (suppl.3), 207-212.
- DeMarini, D.M., Shelton, M.L and Bell, D.A., Mutation spectra in *Salmonella* of complex mixtures: comparison of urban air to benzo [a] pyrene. Environ. Mol. Mutagen 1994. 24, 262-275.

- DeMarini, D.M.. Environmental mutagens/complex mixtures, in A.P. Li and R.H. Heflich (Eds.), Genetic Toxicology, CRC Press, Boca Raton (1991), FL, pp. 285-302.
- Duque Henao Adriana, Margarita Zuleta, Carlos Peláez, Paula Salazar y John Fredy Quintero. 2005. Efecto mutagénico de los afluentes que abastecen una planta de potabilización de aguas e influencia del tratamiento sobre dicho efecto. Aceptado para publicar en Actualidades Biológicas.
- Fracasso, M. E., Franchetti, P., Mossini, E., Tieghi, S., Perbellini, L., Romeo, L., Exposure to mutagenic airborne particulate in a rubber manufacturing plant. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 1999. 441, 43-51.
- Garrison, A., Hill, D., Organic pollutants from mill persist in downstream waters. Amer. Dysest 1972. Rep. 61, 21-25.
- Garry, S., Nessler, F., Aliovat, E., Haguenoer, J.M., Marzin, D., Mutat. Res 2003. 534, 33-43.
- Geary, L.F., Bleczínsky, W., Harvey, R.G., Penning, T.M., Citotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase. Chemico-Biological Interactions 1996. 99, 55-72.
- Goto, S., Endo, O., Matsumoto, Y., Sakai, S., Akutagawa, T., Asanoma, M., et al., Mutagenicity of airborne particle, river water and soil in Japan. Environ. Mutagen. Res 2000. 22, 45-54.
- Granella, M., Bullarin, C., Nardini, B., Marchioro, M., Clonfero, E., Mutagenicity and contents of polycyclic aromatic hydrocarbons in new high viscosity naphthenic oils and used and recycled mineral oils. Mutat. Res 1995. 343, 145-150.
- Guttenplan, J. B., N – nitrosamines: bacterial mutagenesis and in vitro metabolism. Mutat. Res 1987. 186, 81-134.
- Guzzella I and Sora, S., Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in northern Italy. Wat. Res 1998. Vol 32, N° 6, 1733-1742.
- Hartmann, A., A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H.J. Martus, A. Fjällman, W., et al., Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test, Food Chem. Toxicol. 39 (2001) 103–118.
- Hakura, A., Susuki, S., Sawada, S., Sugihara, T., Hori, Y., Uchidas, K., et al., Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2003.37: 20-27.
- IARC, 1975. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some aromatic azo compounds. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 357 p.p.
- Kamer I, Rinkevich B., *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line[J]. Toxicol in Vitro 2002, 16: 177-184.
- Kataoka, H., Hayatsu, T., Hietsch, G., Steinkellner, H., Nishioka, S., Narimatsu, S., et al., Identification of mutagenic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water in the Danube River. Mutat. Res (2000). 466, 27-35.
- Kleinsasser H, Norbert E, Kastenbauer R, Weissacher H, Muenzenriedes K., Phthalates Demonstrate Genotoxicity on Human mucosa of the Upper Aerodigestive Tract. Env Mol Mutagen 2000. 53: 9 – 12.

- Koreda, M., Moor, P.D., Wislog, P.G., Binding of a benzo a pyrene 7, 8 diol, 10- epoxyde to DNA, RNA and protein of mouse skin occurs with high stereo selectivity. *Science* 1978. 199, 778-781.
- Kusamran, W.R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M., Sugimura, T., Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutat. Res* 1994. 325, 99-104.
- Kutlu, M., Aydogan, G., Susuz, F., Özata, A., The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk river in Turkey. *Environ. Toxicol and Pharm* 2004. 17, 111-116.
- Levin, D.E., Yamasaki, E., Ames, B.N., A new Salmonella strain (TA97), for the detection of frame shift mutations: a run of cytosines as a mutational hot spot. *Mutat. Res* 1982. 94, 315-330.
- Levine, J.G., Schaaper, R.M and DeMarini, D.M., Complex frame-shift mutations mediated by plasmid pKM101: mutational mechanism deduced from 4-aminobiphenyl induced mutation spectra in Salmonella. *Genetics* 1994. 136, 731-746.
- Li, Y.Q., Wu, Y.L., Chen, Y.G., Kong, Z.M. Genotoxicity evaluation and a primary risk assessment of organic pollutants in the drinking waters sources of Nanjing, China. *Journal of Environmental Sciences* 2006. 18(5), 983-988.
- Lijinsky, W., N- nitroso compounds in the diet. *Mutat. Res* 1999. 443, 129-138.
- Maguire, J.R., Tkacz, R.J., Ocurrence of dyes in the Yamasaka river, Quebec. *Water Pollut. Res. J. Can* 1991. 26, 145-161.
- Maluf S W, Erktmann B,. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis block micronuclci analysis and single cell gel electrophoresis assay[J]. *Mutat Res* 2000, 47 I : 17-21
- Maron Dorothy M and Ames Bruce N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res* (1983).113: 173-215.
- Marston C, Pereira C, Ferguson J. Fisher K, Hedstrom O, Dashwood WM, Baird. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) on the tumor initiation, PHA – DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PHA in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 2001. 22: 1077-108.
- Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Bijarnia, M.K. Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye of Sanganer, Jaipur (India): a case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005. 61: 105-113.
- McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Hugget, A., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochrome p-450. *Cancer. Res* 1990. 50, 3367-3376
- Meléndez I, Zuleta M, Marín I, Calle J y Salazar D. Efecto mutagénico de aguas de consumo Tratadas en la Planta Villa Hermosa. *IATREIA* (2001), Vol. 14 N°3:167-175.
- Mitch, W.A., Gerecke, A.C., Sedlak, D.L., A N-Nitrosodimethylamine (NDMA) precursor analysis for chlorination of water and wastewater. *Wat. Res* 2003. 37, 3733-3741.
- Mitch, W.A., Sedlak, D.L., *Water. Sci. Techn. Water Supply* 2002. 2(3): 191-8.

- Mylynen, P., Kurttila, T., Vaskivuo, L., Vähäkangas, K., DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MFC-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxic. Letters* 2007. 169, 3-12.
- Nukaya, H., Shiozawa, T., Tada, A., Terao, Y., Ohe, T., Watanabe, et al., Identification of 2-[2-(acetylamino) – 4 – amino – 5 - methoxyphenil] – 5 – amino – 7 – bromo – 4 –chloro -2h-benzotriazole (PBT-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutat. Res* 2001. 492, 73-80.
- Nukaya, H., Yamashita, J., Tsuji, K., Terao, Y., Ohe, T., Sawanishi, H., et al., Isolation and chemical structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem. Res. Toxicol* 1997. 10, 1061-1066.
- Ohe T. Quantification of mutagenic / carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, TriP- P1, TriP – P2 and PhIP contributing highly to genotoxicity of river water (1997).
- Ohe. T., White, P., DeMarini, D, Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutat. Res* 2003. 534, 101-112.
- Ono, Y., Somiya, I., Oda, Y., Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water. *Water Research* 2000. 34, 890-894.
- Onodera, S., Characterization and determination of organic compounds in the mutagenic XAD-2 extracts of drinking water. **Journal of Chromatography A** 1991. Volume 557, Pages 413-427.
- Pfau, W., Rosenvold, K., Young, J.F. Formation of mutagenic heterocyclic aromatic amines in fried pork from Duroc and Landrace pigs upon feed supplementation with creatine monohydrate. *Food and chemical toxicology* 2006. 44: 2086-2091.
- Prival, M.J., The Salmonella mutagenicity assay: promises and problems. *Ann. NY. Academy. Sci* 1983. 407, 154-163.
- Rajaguru P. Vidya L. Baskarathupathi B. Kumar P. Palanivel M. Kalaiselvi K. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutat. Res* 2002. 517, 29-37.
- Ramirez, J., Gutiérrez, F., Vargas, A., Respuesta de la comunidad fitoplanctónica a experimentos de eutrofización artificial realizados en la represa la Fé, el Retiro, Antioquia, Colombia. *Caldasia* 2005. 27, 103-115.
- Rand, G. M and Petrocelli, S. R., *Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications*. Hemispheric Publishing Corporation, Washington 1985. USA.
- Reifferscheid, G., Heil, J., Zahn, R.K., Die erfassung von genotoxinen in wasserproben mit dem *umu*-mikrotest (Detection of genotoxins in water samples using the *umu*- mikrotest). *Vom Wasser* 1991. 76, 153-166.
- Sasaki, Y.F., Saga, A., Akasawa, M., Yoshida, K., Nishidate, E., Su, Y.Q., et al., *mutat. Res* 1997. 395, 189.
- Shamsudin, A.K.M and Ghan, R., Immunocytochemical localization of benzo a pyrene DNA adducts in human tissues. *Hum. Pathol* 1988. 19, 309-315.
- Shen, J.H., Gutendorf, B., Vahl, M.M., Shen, L., Westendorf, J., Toxicological profile in surface water from an area in Taihu Lake and Angtze, Delta. *Toxicology* 2003. 166, 71-78.

- Shiozawa, T., Tada, A., Nukaya, H., Watanabe, T., Takahashi, T., Asanoma, M., et al., Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole- type mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi. *Chem. Res. Toxicol* 2000. 13, 535-540.
- Singh N.P, McCoy M, Tice R, Edgard E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988. 175:184-191
- Sousa, J., Snyderwine, E., Turesky, R., Turteltaub, W., Davis, C., Sadieh, N., et al., Dietary factors affecting the urinary mutagenicity assay system. I. Detection of mutagenic activity in human urine following a fried bleed. *Mut. Res* 1995. 149, 356-374.
- Speit, G., Hanlet, S., Helbig, R., Seidel, A., Hartmman, A., *Toxicol. Lett* 1996. 88, 91.
- Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC, 8/27-8/32, 1995.
- Sugimura, T., 2000. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*. 21, 387-395.
- Sujbert, L., Ràez, G., Szende, B., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., Török, G., Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames –test. *Toxicology* 2006. 219, 106-112.
- Taylor, M.S., Setzer, R.W., DeMarini, D.M., Examination of the additivity assumption using the spiral and standard Salmonella assay to evaluate binary combinations of mutagens. *Mutat. Res* 1995. 335, 1-14.
- Turesky, R., Lang, N., Butler, M., Teitel, C., Kadlubar, F., Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* 1991. 12, 1839-1845.
- Umbuzeiro, G., Roubicek, D., Rech, C.M., Sato, M.I., Claxton, L. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the salmonella assay and different water extraction procedures. *Chromosome* 2004, 54: 1589-1597.
- Urano Y., Mutagenic actives of exhaust gas and ash from sludge incineration plants. *Sci. Total Environ* 1998. 215(1-2): 41-49
- Ushiyama, H., Wakabayashi, K., Hirose, M., Nukaya, H., Itoh, H., Sugimura, T., Nagao, M., Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but no impatiens reciving parental alimentation. *Carcinogenesis* 1991. 12, 1417-1422.
- Vaghef, H., Wisen, A.C., Hellman, B., *Pharmacol. Toxicol* 1996. 78, 37.
- Vargas, V.M.F., Miglivaca, S.B., Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R. Sa Ferreira, I.C.F., Pestana, M.H.D., Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metal and organic contaminants. *Mut. Res.* 490 (2001) 141-158.
- Watanabe, T., Takahashi, Y., Takahashi, T., Nukaya, H., Terao, Y., Hirayama T., Wakabayashi, K. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole type mutagens. *Mut. Res* 2002. 519: 187-197.
- White P., The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mut Res* 2002. 515:85 – 98.

- Yamasaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P., Shimada, T., Cytochrome p450 2E1 y 2A6 enzymes as major catalysis for metabolic activation of N – nitrosodialkylamines and tobacco related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1992. 13, 1789-1794.
- Yang M, Kim S, Lee E, Cheon H, Chang S, Kang D., Source of polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure In Non-Occupationally Exposed Koreans. *Envi. Mol. Mutagen* 2003. 42(4): 250-258.
- Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y., Kong, Z.M., Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Elisenia fetida*. *Environ. Pollut* 2000. 108, 271-278.
- Zhong, Y., Feng, S.L., Luo, Y., Zhang, G.D., Kong, Z.M., Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong City using the *Vicia faba* micronucleus test and the comet assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 2001. 67, 217-224.
- Zhu, H., Boobis, A.R., Gooderham, N.J., The food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine activates S-phase checkpoint and apoptosis and induces gene mutation on human lymphoblastoid TK6 cells. *Cancer Res* 2000. 60: 1283-1289.
- Zuleta, M., Uribe, Y., Valencia, C., Vargas, H., Orozco, L.Y., Lopez, C., Contribución de la contaminación y cloración en la Mutagéncidad, genotoxicidad y presencia de mutágenos en agua potable. *Actual. Biol* 2004. 26, 125-136.

Producto 2. Artículo

**MUTAGENICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE DOS SITIOS QUE ABASTECEN UNA
PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS**

**MUTAGENICITY AND GENOTOXICITY FROM TWO SITES THAT SUPPLY A
WATER TREATMENT PLANT**

**Héctor Hugo Cárdenas Pérez, Iván Meléndez Gelvez, José Fernando Oñate, Ary
Fabián Paruma, y Margarita Zuleta Bustamante**

Laboratorio de Mutagénesis Ambiental

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Antioquia

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la actividad mutagénica y genotóxica producida por diferentes extractos de agua provenientes de fuentes que surten una planta de tratamiento de aguas para el consumo humano, tales fuentes fueron: agua cruda del río pantanillo cerca a la población del Retiro después de haber pasado por una planta biológica, y agua cruda del río Negro antes de entrar a la planta de tratamiento de aguas. La actividad mutagénica se evaluó mediante el test de Ames en *Salmonella typhimurium*. Se encontró que en el agua cruda del río Pantanillo la mutagenicidad indirecta supero 8 veces el control, y que en el agua cruda antes de entrar a la planta de tratamiento, la mutagenicidad fue de 7 veces la mutagenicidad del control, La alta mutagenicidad observada en el río Pantanillo puede deberse a que recibe las aguas negras de poblaciones aledañas que contiene residuos domiciliarios, aceites y agroquímicos provenientes del aeropuerto y cultivos cercanos. También el río Pantanillo recibe descargas de aguas tratadas en una planta a base de lodos activados, las cuales se ha comprobado por estudios anteriores contiene compuestos que inducen alta actividad mutagénica. Este hallazgo nos indica que la mayoría de los compuestos que se detectan en el río Pantanillo podrían ser transportados hasta la planta de tratamiento.

Se probaron varias dosis de agua en el ensayo cometa y se detectó alta genotoxicidad en linfocitos humanos, se observó la misma tendencia que en el ensayo de *Salmonella*, lo que confirma los resultados obtenidos por este, por lo tanto se puede decir que los mutágenos allí presentes pueden dañar el ADN de linfocitos humanos y por ende esto implica un factor de riesgo para nuestra salud.

Palabras claves: aguas negras, aminas heterocíclicas, mutágenos, contaminación, ensayo cometa, hidrocarburos policíclicos aromáticos

ABSTRACT

In this work the mutagénic and genotoxic activity produced by different extracts of water that provides a plant of treatment of waters for human drinking water was evaluated: it sources was raw water of the Pantanillo river it fences the population from the Retiro after having gone by the biological plant, and raw water of the negro river before entering to the waters treatment plant. The mutagenic activity it was evaluated By means of the Ames test's in *Salmonella typhimurium*.

It was found that the raw water of the Pantanillo river showed high indirect mutagenicity that I overcome 8 times the control, and in the raw water before entering to the treatment plant, the mutagenicity was of 7 times the indirect mutagenicity of control, the high mutagenic activity seem can be due to the fact that receive the waste water from near populations that contain domiciliary residuals, oils and agrochemicals coming from the airport and near cultivations arrive. Also the Pantanillo river receive treated waters from activated sewage plant, it comproved in previous studies that it contain rice high mutagenicity compounds. This indicated us that most of compounds that detect it at Pantanillo river they could to be transported till the treatment plant.

Several dose of water was tested in the COMET assay it makes and detects high genotoxicity in human lymphocytes, one observes the same tendency that in the rehearsal of Salmonella, what confirms the results obtained by it, therefore one can say that the mutagens there present can damage the DNA of human lymphocytes and besides this implies a factor of risk for our health.

Key words: wastewater, heterocyclic amines, mutagens, pollution, comet assay, polycyclic aromatic hydrocarbons.

Introducción

Las aguas superficiales son depositarias de descargas domésticas y de residuos agrícolas e industriales, cargados de mutágenos (Alves de Lima et al 2006., Junior H. M et al 2007., Liu J. R et al 2007., Pérez D. V et al 2007). Estas aguas en muchos casos suplen plantas de tratamiento de aguas para consumo humano, estas se encuentran en muchos casos contaminadas con pesticidas los cuales se ha demostrado su carcinogenicidad (Aleem A y Malik A 2005), estos también pueden llegar por escorrentías provenientes de los suelos de cultivo, ya que los mutágenos en los suelos son lavados por las lluvias y pueden llegar hasta los ríos cercanos (Cerna et al 1996., Edenharder R et al 2000., Ohe T et al 2003), también las aguas se contaminan con metales pesados como el Cd, Cr, Mg, As y Pb entre otros, los cuales en gran concentración pueden ser mutacarcinogénicos (Wong P.K. 1988., Rossman T.G. et al 1991). El humo proveniente de las chimeneas de industrias y automotores es peligroso también porque contiene en pequeñas concentraciones metales pesados, los cuales llegan a las aguas de los

ríos (Vargas V.M. F et al 2001). Las aguas de los ríos que abastecen plantas de tratamiento están contaminadas con aguas negras con presencia de compuestos mutagénicos como las aminas heterocíclicas (AHs) y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) (Ohe T 1997., Shen L et al 2003., Hewitt et al 2005., Yang M et al 2003., Jägerstad y Skog 2005). Las descargas domiciliarias son ricas en orina y heces (Viberg P et al 2006), las aminas heterocíclicas se forman en las partes quemadas de alimentos proteicos ricos en creatina, tal como las carnes fritas y asadas, por lo tanto la orina y heces fecales de personas que se alimentan con estas carnes, contienen dichas AHs.

Una planta de tratamiento de aguas suministra agua potable a la población de Rionegro, con alrededor de 100.000 habitantes. La planta de tratamiento de aguas se abastece del río Negro que pasa por regiones rurales de donde recibe aguas residuales domiciliarias. El río Negro también recibe la contaminación de algunos afluentes como la quebrada Chachafruto la cual se contamina mediante aguas negras y escorrentías del aeropuerto cercano y residuos industriales de la zona franca del municipio (Duque et al 2005). Además este río en su parte alta llamada río Pantanillo, recibe las aguas negras de la población del Retiro, después de que dichas aguas han sido tratadas en una planta biológica a base de lodos activados instalada allí. Se ha demostrado que muchos de los mutágenos contenidos en estas aguas negras no son extraídos por la planta a base de lodos activados, tal es el caso de las AHs Trp-P1, Trp-P2, AαC, IQ y MeIQx (Orozco et al., 2003). El río Pantanillo surte una represa, la cual surte de agua a la planta de aguas la Ayurá que distribuye agua potable a millón y medio de personas (Orozco J., Zuleta M 2000). La evidencia epidemiológica ha demostrado relación entre el consumo de aminas heterocíclicas y la ocurrencia de cáncer colorectal (Martson et al 2001., Felton et al 2002), alta incidencia de cáncer en el intestino delgado y grueso en próstata y páncreas en roedores (Shirai T et al, 1997., Hirose M et al 2000). Esto es preocupante porque los mutágenos presentes en el agua de consumo llegan continuamente a la población en cantidades muy pequeñas ppb aparentemente permisibles, estas concentraciones no producen muerte celular y por ende pueden causar daño genético acumulable, hasta originar enfermedades tales como el cáncer (Pohjola et al 2003) y si fuera células germinales aumentan las enfermedades hereditarias (Poirer and Beland 1992). El propósito de este estudio es realizar la detección de mutágenos en el río que abastece la planta

de tratamiento de aguas, desde el río Pantanillo hasta pocos metros antes de entrar a la planta de tratamiento de aguas de Rionegro.

Materiales y métodos

Toma de Muestras

Se muestrearon dos sitios (Fig 1), sitio 1: río Pantanillo a 2 km después de recibir aguas negras procedentes de Retiro, previamente tratadas biológicamente y sitio 2 río Negro agua antes de entrar a la planta de tratamiento Cada muestra se tomó en tres ocasiones diferentes, en los mismos sitios, en la mañana (08 – 12 m) en invierno. El volumen total colectado de cada muestra fue de 100 litros.

Concentración y extracción del material orgánico del agua.

El material orgánico contenido en 100 litros de agua, se concentró en una columna de vidrio que contiene 100 g de resina XAD-7 y 100 g de resina XAD-2, el agua se pasó a través de la columna a una velocidad aproximada de 15 mL/min. Se eluyó con acetona, metanol y éter. Los eluyentes se retiran por rotaevaporación a baja presión y 60 °C hasta la sequedad y luego se determina el peso del extracto, éste se conserva seco a 4°C para test de Ames, ensayo cometa y análisis posteriores.

Detección del efecto mutagénico por el test de ames

El efecto mutagénico de los extractos del material orgánico del agua se evaluó por medio del test de mutagenesis en *Salmonella*, usando el protocolo descrito por Marón y Ames (1983). Se trabajó con dos cepas de *Salmonella typhimurium*, la cepa TA – 98, en la que se produce la reversión a his+ por corrimiento del marco de lectura y la cepa TA – 100 en la cual se produce la reversión por sustitución de un par de bases. De cada extracto de río se evaluó la mutagenicidad de dosis que no sean tóxicas: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mg de extracto total equivalentes a 83, 166, 250, 333, 416, 500 y 583 mL de agua, en cada muestra de río respectivamente. Para el control positivo se utilizó 2-aminofluoreno (2-AF) el cual es un

mutágeno indirecto que necesita activación metabólica (S9) para producir acción mutagénica. Como control negativo se usó DMSO al 50 %.

Para cuantificar la mutagenicidad se usó el índice mutagénico (IM). Este índice se refiere a las veces que el número de mutaciones producidas por la muestra contiene las mutaciones del control negativo o sea las mutaciones espontáneas.

Detección de daño del ADN de células humanas por el ensayo COMETA

El daño en el DNA se detectó en linfocitos humanos. Estos se aislaron de sangre periférica de un hombre sano, no fumador. El ensayo Cometa se procesó según la metodología propuesta por Singh *et al.*, (1988) y modificada por Pandrangi *et al* (1995). Las dosis evaluadas fueron 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 mg que equivalen a 42, 83, 125, 167, 208 y 250 mL de agua en su orden. Se analizaron 100 células por cada tratamiento. El daño en el DNA se midió con base en la longitud en μm de la migración de los fragmentos del DNA (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola se supone que hubo más fraccionamiento del DNA). Daño 0 hasta 23 μm , daño 1 de 23 μm hasta 40 μm , daño 2 de 41 μm hasta 60 μm daño 3 de 61 μm hasta 80 μm y daño 4 de 81 μm en adelante.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por medio del test de Ames se analizaron por medio de la prueba de Kruskal – Wallis del programa SPSS para muestras independientes y los de cometa se analizan por medio de la prueba t de student de dos colas en el programa de Excel de office. Para determinar la diferencia significativa entre el daño del control negativo y el de cada tratamiento o para comparar el daño producido en dos experimentos diferentes. Los resultados de cada dosis se presentan como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

RESULTADOS

Mutagenicidad evaluada por el test de Ames

Los resultados de la actividad mutagénica, se resumen en la tabla 1. En la cepa TA 98 se detectó alta mutagenicidad en las muestras de agua de los dos ríos, en presencia de S9. Extractos de agua provenientes de río Negro mostraron efecto de dosis a partir de 83 mL hasta 500 mL con un incremento de 0,0012 según la curva de regresión lineal con una $P < 0,05$ entre el control negativo y la primera dosis de tratamiento. El río Pantanillo en la cepa TA 98 más S9, produjo efecto de dosis con dos pendientes: en las primeras tres dosis a partir de 83 mL hasta 250 mL la actividad mutagénica obedeció a un incremento de 0,007 y un incremento más alto producido en 333 mL hasta 500 mL con una pendiente de 0,013, con una $P < 0.05$, fig. 2a. Se observó efecto mutagénico débil en la cepa TA 100 con y sin S9 en los dos ríos, IM de 2.9 a una concentración de 583 mL en el río Pantanillo y IM de 2.3 a una dosis de 500 mL en el río Negro, fig. 2. Se observó actividad mutagénica débil en ausencia de S9, en los dos ríos en la cepa TA 98. Los valores máximos fueron en el río Negro IM de 2,5 para 500 mL equivalentes y en el río Pantanillo 3,1 para 583 mL equivalentes fig. 2.

Daño en el ADN evaluado por el ensayo COMETA

En la tabla 2 se presentan los datos del efecto genotóxico en linfocitos humanos evaluados con el ensayo COMETA. En general se puede mencionar que a partir de la dosis de 42 mL equivalentes hasta 250 mL hubo efecto de dosis que se ajustó a la cola del cometa habiendo un daño tipo 3 con una pendiente de $Y = 0,098x$ en el río Negro, hay diferencia significativa con $p < 0.01$ a partir de la dosis de 42 mL y el control negativo. En el río Pantanillo se presentó un aumento desde 42 mL hasta 125 mL con una pendiente de $Y = 0,114x$ y luego la curva aumento desde 167 mL hasta 250 mL fig 3. El porcentaje de viabilidad disminuyó de acuerdo a el aumento de la dosis tabla 2 y fig 4. En el río P en la dosis de 42 mL la viabilidad fue 86 % con un daño tipo 1, en la dosis de 83 mL la viabilidad fue de 81 % con un daño tipo 1, en 125 mL fue de 72 % con un daño tipo 1, en la dosis de 167 mL el porcentaje de supervivencia fue 59 % y el daño fue tipo 2, en 208 mL él % fue de 47 % con daño tipo 2 y 250 mL el porcentaje fue 38 % con daño tipo 3. En el río Negro en la dosis de 42 mL el porcentaje de viabilidad fue de 91 % y un daño tipo 1, en

la dosis de 83 mL fue de 83 % con daño tipo 1, en 0.75 el porcentaje fue de 72 %, el daño aumento en la dosis de 167 mL con un porcentaje de 59 % y un daño tipo 2, en 208 mL el porcentaje de viabilidad fue 52% y daño tipo 2 y en la dosis de 250 mL con un 36 % de viabilidad y un daño tipo 3.

DISCUSION

En este estudio se evaluaron varias muestras de agua procedentes de dos ríos (Pantanillo y Negro próximo a la descarga de agua a la planta de tratamiento), con el fin de saber si los niveles de actividad mutagénica producida por el río Pantanillo podrían tener las mismas características que las del río Negro al entrar a la planta y así inferir si los mutágenos presentes en las aguas negras que recibió el río Pantanillo son los mismos que llegan al río Negro metros antes de entrar a la planta.

Todas las muestras de agua tanto en el río Pantanillo como en el río Negro en la entrada a la planta de tratamiento de aguas mostraron un invariable incremento en la actividad mutagénica en la cepa TA 98, solo con activación metabólica (S9), tabla 2 y fig 2a, lo que sugiere la presencia de mutágenos indirectos que producen pérdida o ganancia de bases, características que son propias de mutágenos tales como las aminas heterocíclicas (AHs), o los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), los cuales son abundantes en aguas negras domiciliarias. En la cepa TA 100 con S9, la actividad mutagénica fue débil, solo produjo 2,9 veces el control negativo en el río Pantanillo. En ausencia de S9 la actividad mutagénica de los dos ríos en cualquiera de las dos cepas, fue débil, en 500 mL de agua la mutagenicidad directa supero tres veces el control negativo, en cambio cuando se adicionó S9, los extractos de agua tanto del río Pantanillo como del río Negro antes de entrar a la planta, producen una mutagenicidad indirecta entre 7 y 8 veces el control, lo que rectifica que la mayoría de los mutágenos presentes en estas aguas son indirectos que necesitan activación metabólica. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos (Kataoka et al 2000). En estudios anteriores en nuestro laboratorio Zuleta et al (2004) encontró alta mutagenicidad en la cepa TA 98 con S9 en el agua cruda que abastece esta planta de tratamiento, obteniendo valores de 7 veces el control negativo y poca mutagenicidad en la cepa TA 100 con y sin S9. En la identificación de compuestos mediante GC – MS se halló

mutágenos como el Fenantreno, el Benzo (a) antraceno, Di – Benzo (a) antraceno y Bi – fenantreno que son HPAs y actúan de forma indirecta para causar daño por pérdida o ganancia de bases. La poca recuperación de mutación directa en este trabajo puede deberse a la volatilidad e inestabilidad de dichos compuestos, ya que su sitio electrofilico puede reaccionar fácilmente con muchos compuestos antes de llegar al ADN celular. Mutágenos como las AHs IQ y el Trp–P2 se han detectado en las aguas negras tratadas biológicamente antes de verterlas al río P (Orozco y Zuleta 2000) estos mutágenos son indirectos, producen mutación por ganancia o pérdida de bases, se encuentran en las aguas negras domiciliarias, las cuales contienen heces y orina ricas en estos compuestos.

Las aguas negras del municipio Retiro son tratadas en una planta de lodos activados y luego son vertidas al río Pantanillo el cual se convierte en el río Negro que luego entra a la planta de tratamiento de aguas para ser usada como agua potable, se sabe que esta planta no retiene la totalidad de mutágenos, **(Orozco)** en este estudio comprobamos que el río Negro también produce alta mutagenicidad, casi igual al río Pantanillo, posiblemente porque el río Negro además, de contener los mutágenos provenientes de las aguas negras tratadas en la planta biológica, atraviesa varios caseríos, recibe también a la quebrada Chachafruto la cual aporta aguas negras que vienen del área industrial y del aeropuerto cercano al municipio. Estas aguas negras pueden contener además residuos como gasolina, aceites quemados y otros químicos con HPAs y pesticidas, que pueden ser responsables también de la mutagenicidad indirecta detectada. Mediante el ensayo COMETA medimos el daño producido por compuestos contenidos en extractos de agua de los ríos en estudio. Los datos de este estudio con linfocitos humanos indican que las muestras de agua pueden penetrar en las células humanas y dañar el ADN, lo que implica alto riesgo para la salud humana debido a los mutágenos presentes en el agua.

Es posible que los mutágenos que llegan al río Pantanillo no solo provienen de residuos domiciliarios sino también de carpinterías que usan solventes y lacas e inmunizadores de maderas.

Bibliografía

- Aleem A y Malik A. (2005). Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61; 404 – 412
- Alves de Lima Rodrigo Otavio., Bazo Ana Paula., Favero Salvadori Daisy Maria., Rech Celia Maria., Oliveira Danielle de Palma., Umbuzeiro Gisela de Aragao. (2006). Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutat. Res, Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*
- Cerná M., Pastorkova A., Smíd J., Bavorová H., Ocadlíková D., Rössner P., Zavadil J. (1996). Genotoxicity of industrial effluents, river waters and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. *Toxicology Letters*, 88; 191 – 197
- Duque Henao Adriana., Peláez Carlos Alberto., Arenas Armando., Salazar Paula., Quintero John Fredy y Zuleta Bustamante Margarita. (2005). Influencia del tratamiento con sulfato de aluminio sobre la mutagenicidad del agua cruda que abastece una planta de potabilización, Aceptado para publicar en *Actualidades Biológicas*
- Edenharder R., Ortseifen M., Koch M Wesp H.F. (2000). Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutation research*, 472; 23 – 36
- Felton J S., and Knize M G., Salmon C. P., Malfatti M. and Kulp K. S. 2002. Human Exposure to heterocyclic amines Food mutagens/carcinogen. Relevance to Breast Cancer. *Environ mol Mutagen Vol 39. pp 112 – 118.*
- Hewitt L. Mark., Marvin Chris H. (2005). Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents, *Mutation Research* 589 208–232
- Hirose M., Yamaguchi T., Lin C., Kimoto N., Futakuchi M., Kono T (2000) Effects of arctin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague–Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats, *Cancer Lett.* 155 79–88.

- Jägerstad M y Skog K. (2005). Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*. Article in press.
- Junior Horst Mitteregger., da Silva Juliana., Arenzon Carina Alexandre., Portela Saraiva., Fernands de Sa Ferreira Isabel Cristina., Pegas Henriques Joao Antonio. (2007). Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere* 67 1211–1217
- Kataoka Hiroyuki., Hayatsu Toshiko., Hietsch Gerhard., Steinkellner Hans., Nishioka Sachiko., Narimatsu Shizuo., Knasmuller Siegfried., Hayatsu Hikoya. (2000). Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and A α C/ in the water of the Danube River. *Mutation Research* 466, 27–35
- Liu Jia-Ren., Pang Yong-Xun., Tang Xuan-Le., Dong Hong-Wei., Chen Bing-Qing., SunChang-Hao. (2007). Genotoxic activity of organic contamination of the Songhua River in the north-eastern region of the People's Republic of China. *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* doi:10.1016/j.mrgentox.2007.06.002
- Maron Dorothy M and Ames Bruce N (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutación Res.* 113: 173-215.
- Marston C, Pereira C, Ferguson J. Fisher K, Hedstrom O, Dashwood WM, Baird. 2001. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) on the tumor initiation, PHA – DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PHA in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 22: 1077-1086.
- Ohe T. (1997). Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water. *Mutation research*, 393; 73 – 79

- Ohe T., White P. A y DeMarini D. M. (2003). Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutation research*, 534; 101 – 112
- Orozco L. Y y Zuleta M. (2000). Detección de mutacarcinógenos en aguas del Río Pantanillo y efecto genotóxico de esta agua en el DNA nuclear y mitocondrial de células eucariótica. *IATREIA VOL 13 No.2*
- Orozco L.Y., Lopez C., Naranjo L.C., and Zuleta M. (2003). DNA damage and identificación of mutagenic heterocyclic amines in municipal wastewater which contaminate water purification plants. *Env. Mol Mutagen Vol 41, Sup 34 P 196.*
- Pandurangi R., Petras M., Ralph S., Vrzoc M. (1995). Alkaline single cell gel (commet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen. 26:345-356.*
- Pérez D.V., Alcantara S., Ribeiro C.C., Pereira R.E., Fontes G.C., Wasserman M.A., Venezuela T.C., Meneguelli N.A., de Macedo J.R., Barradas C.A.A. (2007). Composted municipal waste eVects on chemical propertiesof a Brazilian soil, *Bioresource Technology* 98 525–533
- Pohjola S, Lappi M, Honkanen M, Rantanen L and Savela K. (2003). DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis* vol. 18 no. 5 pp. 429
- Poirier M, and Beland F. 1992. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 749 – 55.
- Rossmann T.G., Molina L.W., Boone M.Y., Klein C.B., Wang Z., Li F., Lin W.C (1991). Performance of 133 compounds in the lambda prophage induction endpoint of the microscreen assay and comparison with *S typhimurium* mutagenicity and rodent carcinogenicity assays. *Mutation Research*; 260 349 – 367.
- Shen Lei., Wu Jian-Yong., Lin Guo-Fang., Shen Jian-Hua., Westendorf Johannes., Huehnerfuss Heinrich. (2003). The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai *Chemosphere* 52 (2003) 1641–1646

- Shirai T., Sano M., Tamano S., Takahashi S., Hirose M., Futakuchi M. (1997). The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods, *Cancer Res.* 57 195–198.
- Singh N.P., McCoy, R Tice., and E Edward. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175:184-191.
- Vargas V. M Ferrão., Sayonara B. M., Cássia de Melo A., Horn R. C., Guidobono R. R., Fernandes de Sá Ferreira I. C., y Degrazia Pestana M. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490; 141 – 158
- Viberg P., Wahlund K.G., Sokog K. (2006). On – line capillary based quantitative analysis of a heterocyclic amine in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1133; 347 – 352.
- Wong P. K (1988). Mutagenicity of of heavy metals. *Bull. Environmental contamination toxicol* 40; 597 – 603
- Yang M., kim S., Lee E., Cheong H., Chang S., Kang D., Choi Y., Lee S., Jang J. 2003. Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure in Non-occupationally Exposed Koreans. *Environ Mol Mutagen.* Vol 42 pp 250-257.
- Zuleta Margarita, Uribe Yolanda, Valencia Carlos, Vargas Horacio, Orozco Luz Yaneth y López Carlos. (2004). Contribución de la contaminación y cloración en la mutagenicidad, genotoxicidad y presencia de múgatenos en aguas potables. *Actualidades biológicas*

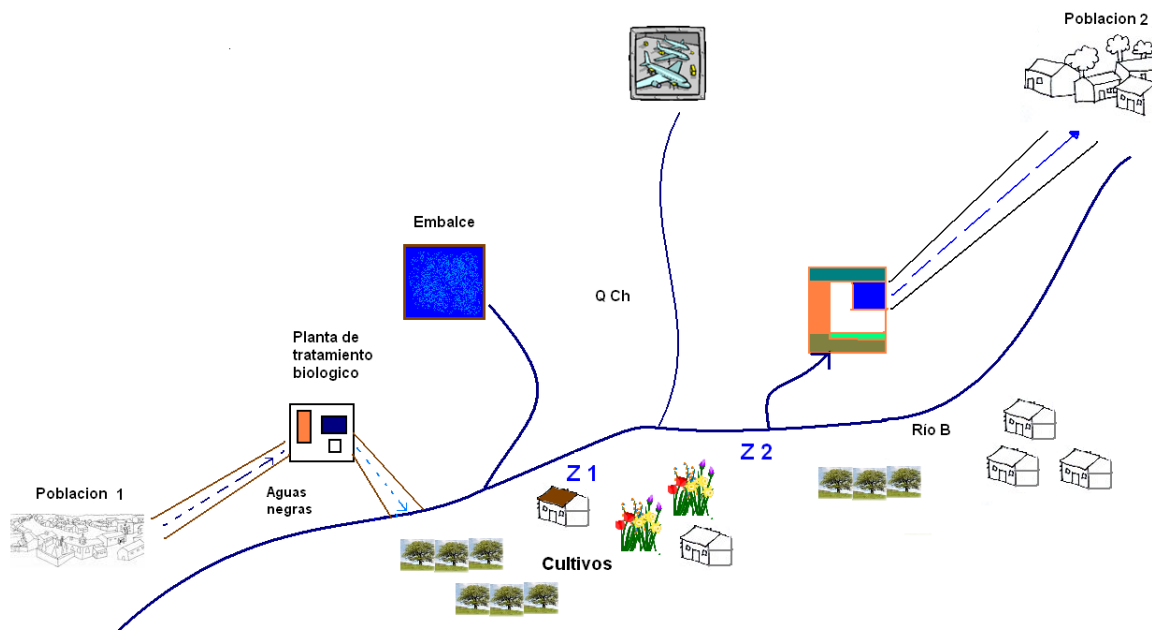


Figura 1. Área de estudio y sitios de muestreo

Tabla 1. Actividad mutágena expresada como la media +/- la desviación estándar del número de revertantes e índice mutagénico (IM) en *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 expuestas a diferentes dosis de extracto total contenidos en mL de agua del río Pantanillo y el río Negro, con activación metabólica (+S9) y sin activación metabólica (-S9).

Dosis en mL de agua equivalentes al contenido de extracto	S9	Mutagenesis							
		TA 98				TA 100			
		Río Pantanillo		Río Negro		Río Pantanillo		Río Negro	
		X ± DS	*IM	X ± DS	IM	X ± DS	IM	X ± DS	IM
Control I H ₂ O	+	14 +/- 2.1	1	14 ± 1	1	70 +/- 2.9	1	72 ± 3	1
	-	14 +/- 1.3	1	14 ± 1	1	71 +/- 4.0	1	73 ± 7	1
Control II DMSO 50 %	+	14 +/- 1.3	1	15 +/- 1	1	71 +/- 4.0	1	72 ± 2	1
	-	15 +/- 1.1	1	13 +/- 1	1	73 +/- 3.4	1	72 ± 7	1
Control III 2AF	+	1887 +/- 70.6	134	2528 ± 206	168	1280 +/- 36.9	18	1314 ± 95	18
	-	28 +/- 3.5	1,8	23 ± 2.9	1,8	67 +/- 3.9	1	78.8 ± 13	1
83	+	21 +/- 1.0	1	16 +/- 1	1	70 +/- 6.8	1	73 ± 2	1
	-	18 +/- 1.6	1	14 +/- 1	1	66 +/- 5.3	1	63 +/- 2	1
166	+	33 +/- 1.6	2.2	33 +/- 3	2.2	68 +/- 4.8	1	88 +/- 3	1.2
	-	23 +/- 2.6	1.5	17 +/- 2	1.3	71 +/- 4.2	1	83 +/- 3	1
250	+	44 +/- 2.8	2.9	45 +/- 2	3	77 +/- 2.7	1	138 +/- 3	1.9
	-	28 +/- 1.2	1.9	20 +/- 2	1.5	75 +/- 3.9	1	88 +/- 7	1.1
333	+	77 +/- 2.5	5.1	77 +/- 3	5.1	89 +/- 5.6	1	188 +/- 2	2.6
	-	27 +/- 1.5	1.8	21 +/- 5	1.6	74 +/- 2.5	1	104 +/- 3	1.4
416	+	91 +/- 2.3	6.0	87 +/- 6	5.8	165 +/- 4.5	2.2	193 +/- 6	2.7
	-	35 +/- 1.9	2.3	31 +/- 8	2.4	94 +/- 4.4	1.3	159 +/- 4	2
500	+	113 +/- 3.2	7.6	101 +/- 5	6.8	176 +/- 5.2	2.4	177 +/- 4	2.4
	-	40 +/- 3.4	2.6	33 +/- 3	2.5	200 +/- 6.9	2.9	177 +/- 5	2.3
583	+	133 +/- 3.5	8.9	93 +/- 4	6.2	198 +/- 11	2.8	144 +/- 3	2
	-	47 +/- 3.4	3.1	27 +/- 8	2	203 +/- 23	2.9	142 +/- 5	1.9
Regresión lineal 1 TA 98 más S – 9		Y ₁ = 0,007x + 0,940 Rango= 83 – 250 R ² = 0,9943		Y = 0,012x + 0,353 Rango = 83 – 500 R ² = 0,9628					
Regresión lineal 2 TA 98 más S – 9		Y ₂ = 0,013x + 0,829 Rango= 333 – 583 R ² = 0,9918							

* IM = Índice mutagénico = relación entre el número de mutaciones producidas por la dosis de tratamiento y el control negativo, la media se obtuvo de tres experimentos independientes y cada experimento se hizo por duplicado.

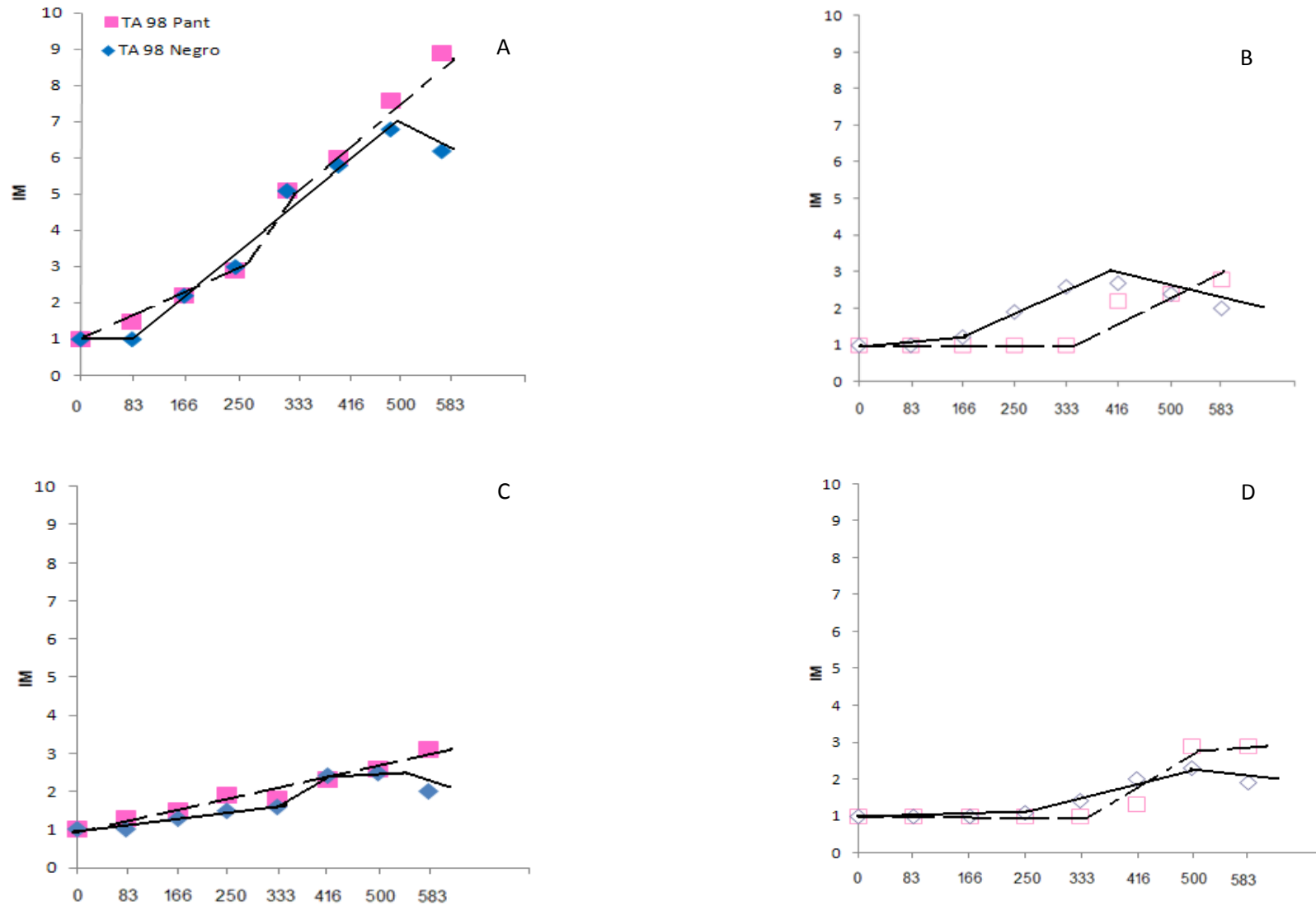


Figura 2. Curva de dosis – respuesta actividad mutagénica de extractos de agua en el test de Ames, agua en el río Pantanillo y aguas al entrar a la planta Rionegro más S9 en las cepas TA 98 en (A) y cepa TA 100 en (B) y sin adicionar S9 en la TA 98 en (C) y en la TA 100 en (D)

Tabla 2. Daño en el ADN basado en la longitud de la cola observado en linfocitos de sangre periférica después de tratar con diferentes dosis de extracto de los ríos Pantanillo y Negro medido con el ensayo COMETA.

Dosis en mL de agua equivalente al contenido de extracto	GENOTOXICIDAD					
	Río Pantanillo			Río Negro		
	X ± DS	Tipo daño	% viabilidad	X ± DS	Tipo daño	% Viabilidad
0	16 ± 2	0	92	19 ± 4	0	92
42	21 ± 2	1	86	27 ± 2	1	91
83	27 ± 2	1	81	30 ± 5	1	83
125	32 ± 2	1	72	36 ± 7	1	75
167	42 ± 8	2	59	40 ± 8	2	60
208	56 ± 4	2	47	59 ± 11	2	52
250	73 ± 4	3	38	68 ± 9	3	36

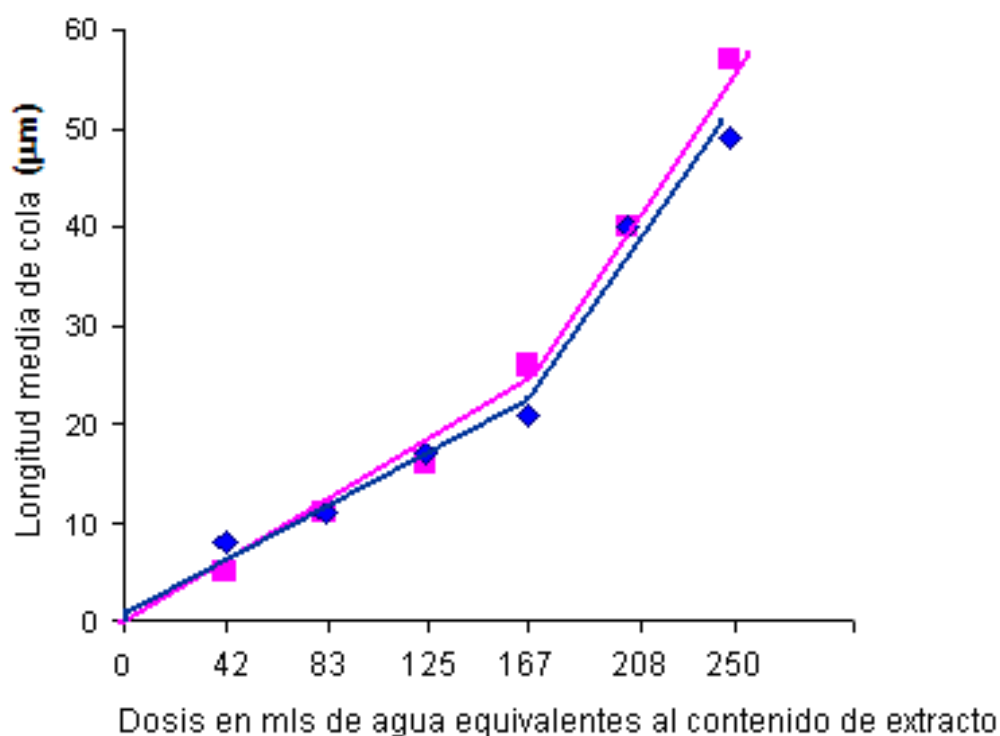


Figura 3. Curvas dosis – respuesta genotóxica ajustada por regresión lineal a la longitud de cola obtenida de sangre periférica, la cual fue tratada con diferentes concentraciones de extracto de las aguas del río negro (◆), y río Pantanillo (■). El daño en el ADN se midió según la longitud en µm de la migración del ADN (cola del cometa)

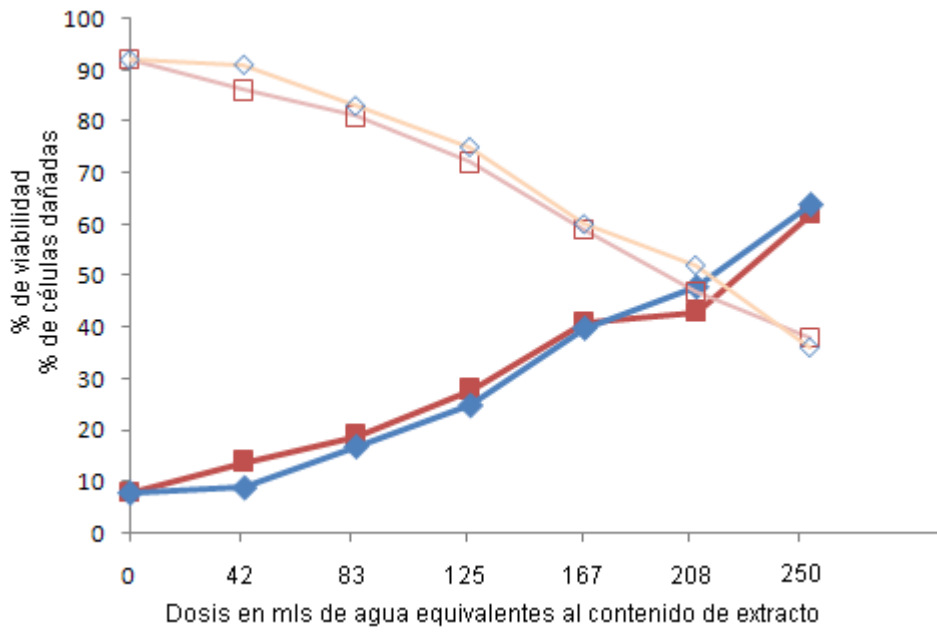






Figura 4. Porcentaje de viabilidad, río Pantanillo () y río Negro () y porcentaje de células dañadas en las muestras de agua del río Pantanillo () y río Negro ()

Producto 3. Artículo

Mutagenicidad y genotoxicidad de aguas para consumo humano antes y después de su potabilización, durante las épocas seca y de lluvia

Claudia Barbosa¹, Briegel De las Salas¹, Mayerling Ossa², Isabel Ortiz³, Carlos Peláez⁴

¹Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^{2,3}Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción: La calidad del agua de consumo humano se determina teniendo en cuenta parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, pero se desconoce el control de compuestos mutacarcinogénicos relacionados con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer y enfermedades hereditarias. Las plantas de tratamiento reciben aguas de ríos y quebradas que contienen sustancias químicas mutacarcinogénicas provenientes de la contaminación con agroquímicos, desechos industriales y aguas negras. Igualmente estos compuestos pueden formarse durante el proceso cloración.

Objetivo: Evaluar la actividad mutagénica y genotóxica de las aguas tratadas en una planta de tratamiento en el departamento de Antioquia.

Materiales y métodos: El estudio se realizó durante las épocas seca y de lluvia, con extractos obtenidos por concentración con resinas XAD2 y XAD7, de las aguas sin tratar, aguas tratada con sulfato de aluminio y agua clorada, mediante dos técnicas, Ensayo de Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, con la cepa TA100 con y sin activación metabólica y Electroforesis en gel de células individuales en linfocitos humanos, con el fin de determinar la mutagenicidad y la genotoxicidad, respectivamente, las muestras se tomaron en las épocas seca y de lluvia. Para determinar la significancia estadística de los resultados se usó Análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados: El Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, evidenció actividad mutagénica en los extractos de agua cruda en presencia y ausencia de activación metabólica en época de lluvia, contrario a lo ocurrido en época seca. La mutagenicidad encontrada en el extracto de agua tratada con sulfato de aluminio en presencia y ausencia de activación metabólica en época de lluvia y época seca, fue significativa. El extracto de agua clorada bajo las condiciones anteriormente descritas, no presentó actividad mutagénica significativa. En la prueba de Electroforesis en gel de células individuales, en general se encontró que los extractos de agua cruda, agua tratada con sulfato de Al y agua clorada en las épocas seca y de lluvia, causan daño en el ADN de linfocitos humanos.

Conclusiones: El tratamiento con sulfato de aluminio incrementa seis veces la mutagenicidad indirecta del agua cruda. La cloración disminuye la mutagenicidad directa e indirecta. Todos los extractos inducen genotoxicidad en las épocas seca y de lluvia, aunque se incrementa en época seca. Se observa efecto de dosis.

Palabras clave: Ensayo de Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, Ensayo Cometa, Daño en el ADN, Linfocitos humanos.

Introducción

En Colombia, la calidad del agua de consumo humano se determina teniendo en cuenta parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, pero se desconoce por completo el control relacionado con compuestos mutacarcinogénicos, que pueden contaminar las aguas que abastecen las plantas de tratamiento de aguas de consumo. Es posible que gran parte de nuestras aguas de consumo contengan mutágenos y carcinógenos ya que las aguas tratadas para consumo humano pueden contaminarse con sustancias químicas mutacarcinogénicas provenientes de la contaminación con agroquímicos, desechos industriales y aguas negras, además, por acción de la desinfección con cloro se forman nuevos mutacarcinógenos por reacción del cloro con el material orgánico que contiene el agua (Monarca S. et al., 2002; Calderon RL., 2000; Hofer M. et al., 2000; WHO, 1996).

Se han identificado contaminantes químicos en aguas para consumo humano (WHO, 1996), los cuales son derivados de desechos industriales, agrícolas, domésticos, como resultado de los procedimientos de desinfección (Monarca S. et al., 2002; Calderon RL., 2000; Hofer M. et al., 2000; WHO, 1996) y a la formación de compuestos mutagénicos derivados de la corrosión de tanques de almacenamiento y las tuberías utilizadas para la distribución del agua (Broo et al., 1999).

Se ha comprobado que los pesticidas llegan a las aguas a través de lixiviados de zonas agrícolas (Pollack et al., 2003; Sierra et al., 1998; Rehana et al., 1996; Rehana et al., 1995;), y por su acumulación en aguas subterráneas que luego llegan a fuentes abastecedoras de agua potable (Bolognesi C. 2003; Thomas et al., 2001; Porter et al., 1999). La mutagenicidad de muchos pesticidas ha sido demostrada, tal es el caso del Glifosato y Maneb-80 ampliamente usados en Colombia (Zuleta et al., 1990). Es importante anotar que hay interacciones sinérgicas en cuanto a la mutagenicidad de insecticidas organofosforados con otros mutágenos aumentando así su riesgo (Wagner et al., 2003). En estudios epidemiológicos se ha encontrado aumento del cáncer de mama en mujeres que tenían trazas del pesticida dicloro difenil cloroetano (DDE) (Olaya et al., 1998). Según Morelli (Morelli, 2000), más de la mitad de los pesticidas han resultado ser potencialmente carcinogénicos. Además se ha encontrado que pesticidas organofosforados como malatión y paratión inducen tumores de mama en ratas (Cabello et al., 2001).

Muchos de los desechos industriales que presentan efecto mutagénico son frecuentemente vertidos a quebradas y ríos que luego son usados para surtir las plantas de tratamiento de aguas para consumo humano (Komulainen H., 2004; Watanabe et al., 2003; Watanabe et al., 2001; Randerath et al. 1999; Vargas et al., 1993). De otro lado el benceno es ampliamente usado como materia prima en la síntesis de plásticos, hules, resinas, nylon, anilina, detergentes, medicamentos, colorantes e insecticidas, por lo tanto, está contenido en muchos residuos industriales (Whysner et al., 2004; Henderson, 1996; Paustenbach et al. 1993) y está asociado con el incremento en la

incidencia de leucemias y mielodisplasias e induce aneuploidias en células madre hematopoyéticas (Giver et al., 2001; Travis et al., 1994). Ftalatos como el dibutil Ftalato (DBP) y diidobutil-ftalato (DiBP) son usados para mejorar el procesamiento químico de materiales plásticos de lacas, cosméticos, juguetes de niños, lubricantes. Se ha demostrado que los ftalatos tienen efectos genotóxicos en células de la mucosa nasal humana y residuos industriales de estos compuestos son vertidos en aguas de consumo (Kleinsasser et al., 2000; USEPA 2000). También se han encontrado mutacarcinógenos en residuos de la industria petroquímica (Vargas et al., 1993), de la manufactura del cuero, de plantas de colorantes y de plantas de papel (; Jäger et al., 2004; Winisberg et al., 1992; Clonfero et al., 1989). El solvente industrial percloroetil (PERC) es ampliamente usado para remover grasa durante los procesos industriales y se ha comprobado que aumenta la incidencia de adenoma renal, adenocarcinoma, leucemia y tumores hepatocelulares (Toraason et al., 2003). Los aceites quemados de las maquinarias industriales y de automotores pueden contener hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que también han sido reportados como mutacarcinogénicos (White, 2002; Alguacil et al, 2002).

La formación de mutacarcinógenos durante el proceso de la cloración de aguas, se debe a que el cloro es altamente reactivo, lo que favorece su interacción con numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos (Zuleta et al., 2001; Maruoka et al., 1985; Fallon et al., 1980). La formación de mutacarcinógenos por acción del cloro depende del pH, la temperatura y consumo de cloro (García et al., 1997; Kavanough et al, 1980), cantidad de carbón orgánico total (TOC) y de la presencia de compuestos inorgánicos como el bromo que contribuye a la producción de organoclorados bromados. Entre los mutágenos más potentes formados por la reacción del cloro con material orgánico están las clorofuranonas como el MX (3-Cloro-4-diclorometil)-5-hidroxy-2-(5H)-furanone), el MA (3-4-(dicloro)-5-hidroxi-2-(5H) furanone) y el E-MX que es un isómero de forma abierta del MX. Se ha encontrado que el MX es responsable de aproximadamente el 50% de la actividad mutagénica en aguas cloradas contaminadas con desechos industriales (Holmbon et al., 1981). En relación con la producción de cáncer, varios estudios han demostrado el riesgo potencial del cáncer asociado con el consumo de agua clorada (Bull et al., 1995). En diversos estudios se ha llegado a la conclusión de que el agua clorada es la responsable de hasta el 18% de los cánceres de recto (8.000 casos anuales) y el 9% de los de vejiga (5.000 casos anuales) por año en los Estados Unidos (Morris, 1995).

Las aguas negras procedentes de domicilios, hospitales, fábricas, estaciones de gasolina etc. están cargadas de gran variedad de mutacarcinógenos entre ellos los Hidrocarburos Policíclicos aromáticos (HPA) tales como el Benzo (a) pireno (BaP) y Dimetilbenzo(a) antraceno (DMBaA), que se forman durante las combustiones incompletas y pirólisis del material orgánico y por lo tanto se encuentran en el humo y cenizas (Yan et al., 2003; Marston et al., 2001; Nagao et al., 2000; Dipper et al., 1991). También se encuentran en el vapor del aceite de los fritos y en el tizne de las

ollas expuestas al carbón y estufas de gas (De la Cruz Rodríguez ER. et al., 2002; Phillip M. et al., 1999; Urano Y, 1998; Lawther P.D et al., 1965). Debe tenerse en cuenta que los mutágenos del humo también llegan a las quebradas y ríos al ser arrastrados por el viento y precipitado a las aguas a través de la lluvia. Todos los HPA estudiados han resultado ser fuertes mutacarcinógenos comprometidos con la formación de diversos tipos de tumores, como cáncer de mama y próstata (Rundle A. et al., 2002; Phillip L. et al., 2002; Rundle A. et al., 2000; Culp S.J.m. et al., 1998). También, se ha encontrado que muchos HPA pueden transformarse en mutágenos directos por fotoreactivación en los cuerpos de agua (Yan J. et al., 2004).

Otros mutacarcinógenos incluidos en todo tipo de humo son las nitrosaminas que se pueden formar durante la combustión con la participación de ácidos nitrosos y óxidos de nitrógeno (Izzotti A. et al., 1998; De Flora S. et al., 1995; Scalan R., 1983). La mayoría de las nitrosaminas estudiadas (aproximadamente 96%) han demostrado ser fuertes mutacarcinógenos (Hamed S. et al., 2004; Godoy W. et al., 2002; Mitacek E. et al., 1999; Spregelhalder B. et al., 1980). Los cánceres más comúnmente producidos por estos compuestos son: gástrico, mamario, vejiga e hígado (Lubet R. et al., 2005; Godschalk R. et al., 2002; Lear C. et al., 2001; Reh B. et al., 2000).

Las aguas negras pueden contener gran cantidad de aminoarenas (AA) carcinogénicas (Ohe T., 1997), que se generan por la descomposición térmica de alimentos ricos en proteínas y creatina cocidos a altas temperaturas, como es el caso de las carnes asadas y fritas y de la morcilla frita (Malfatti M. et al., 2005; Felton J. et al., 2002; Nagao et al., 2000; Felton J. et al., 2000; Zuleta M. et al., 1994). Estas aminoarenas pueden llegar a las aguas negras a través de los residuos de estos alimentos quemados que se adhieren a los utensilios de cocina. Todas las aminoarenas formadas en alimentos expuestos a altas temperaturas (fritos y asados) son potentes mutágenos y la mayoría de ellas han mostrado inducir cáncer en ratas, ratones y simios en diferentes órganos como hígado, pulmón, estómago, mama, intestino, páncreas, colon y vejiga (Hung R. et al., 2004; Snyderwine E. et al., 2003; Sachse C. et al., 2002; Nagao et al., 2000; Delfino R. et al., 2000; Schut H. et al., 1997; Snyderwine E. et al., 1997)

Materiales y métodos

Muestras de agua

Las muestras de aguas se obtuvieron de una planta de tratamiento situada en el departamento de Antioquia, a partir de tres zonas de muestreo: agua (cruda) al entrar a la planta de tratamiento, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada. Cada muestra se tomó en tres ocasiones diferentes en épocas seca y de lluvia. El volumen total colectado de cada muestra fue de 100 litros y se procesaron de acuerdo con lo recomendado para el análisis de aguas (APHA, 1998).

Concentración y extracción del material orgánico del agua

El material orgánico contenido en 100 litros de agua, se concentró en columnas, que contenían 100 g de resina XAD-7 y 100 g de resina XAD-2 (Ruey-Shin J., 1999) a una velocidad aproximada de 15 mL/min. Antes de usar las resinas XAD, se lavaron por extracción Soxhlet consecutivamente con metanol, acetona, por 24 horas con cada solvente. La elusión se realizó con 3 volúmenes de acetona seguida de tres volúmenes de metanol y finalmente con tres volúmenes de dietil éter. Los eluyentes se retiraron por rotaevaporación a baja presión y 60 °C hasta la sequedad y luego se determinó el peso del extracto, éste se conservó a -20°C.

Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*

El efecto mutagénico de los extractos del material orgánico del agua se evaluó por medio del Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, usando el protocolo descrito por Maron y Ames (Maron DM. et al., 1983). En esta prueba el indicativo de la mutación esta dado por la reversión his- a his +, Las revertantes se identifican porque crecen en medio mínimo sin histidina. Se trabajó con la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*, la cual detecta mutación por sustitución de bases. De cada extracto se evaluó la mutagenicidad de las dosis que no fueron tóxicas o que sólo llegaron a LD₁₀. En cada muestra se trataron 1 x 10⁷ bacterias, en presencia o ausencia de enzimas activadoras contenidas en un homogenizado de hígado (mezcla S-9) de rata macho; los extractos en las diferentes dosis se incubaron a 37°C por una hora, y luego se sembró en agar mínimo; el conteo de colonias se realizó después de 48 horas. Fueron utilizados los controles positivos 2-aminofluoreno (2-AF) [10 µg/caja] como mutágeno indirecto que necesita activación metabólica(S-9) para producir acción mutagénica, y Azida de Sodio [5 µg/caja] el cual es un mutágeno directo ya que produce acción mutagénica en ausencia de activación metabólica. Como controles negativos se usaron agua destilada estéril y el solvente DMSO al 50%. Para cuantificar la mutagenicidad se uso el Índice de Mutagenicidad (IM), éste se refiere a las veces que es superada la mutagenicidad del control por el tratamiento. Se catalogará como respuesta positiva, cuando la mutagenicidad de la muestra sea dos veces mayor que la del solvente (equivalente a 3 IM). Este concepto ha sido usado por muchos autores (Watanabe et al., 2003; et al., 2000). Se considera, mutagenicidad débil, cuando el número de mutaciones de la muestra es más de dos veces la mutagenicidad del solvente (2 IM) pero no alcanza a tres veces y este resultado sea reproducible. Los resultados de cada dosis se presentarán como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Electroforesis en gel de células individuales

El daño en el ADN se detectó en linfocitos humanos, aislados de sangre periférica. La separación de los linfocitos se hizo con 5 mL de sangre con gradiente de "Hystopaque", las células se resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} 1995 (Day RP. 1972.). Con el fin de determinar efecto de dosis, los linfocitos se trataron con cinco dosis no tóxicas de cada extracto. Luego se incubaron a 37°C durante una hora. Se determinó la viabilidad celular por microscopia, utilizando el método de exclusión con el colorante azul de tripano (0.02%) antes y después del tratamiento. El ensayo cometa se procesó según la metodología propuesta por Singh *et al.*, 1988 y modificada por Pandrangi *et al.*, 1995 (Pandrangi R. et al., 1995; Singh NP. et al., 1988). En resumen, las células tratadas fueron mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5%, se transfirieron a portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (NMA), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca por mínimo una hora. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH >13) (NaOH 10N y EDTA 200mM) a 4°C por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las rupturas de los sitiosapurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V, 300mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración de 0.02 mg/mL. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Nikon con filtro verde de longitud de onda de 540 nm y con aumento de 400X. Se realizaron tres ensayos independientes, cada uno por duplicado y se analizaron 80 células por cada tratamiento. El daño del ADN se midió con base en la longitud en μm de la migración de los fragmentos de ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola se supone que hay más fraccionamiento del ADN). Para medir el daño también se tuvo en cuenta el porcentaje de células dañadas. Los linfocitos cuyas colas sean mayores a la longitud promedio del control se clasificaron como células dañadas. El daño del ADN se cuantificó visualmente en cuatro categorías según la longitud de la cola (cometa), así, categoría 0: de 0 a 27 μm (control negativo más 2 desviaciones estándar del control), lo cual equivale a no daño; categoría 1: de 28 a 31 μm (más 2 desviaciones estándar del control), tipo de daño bajo; categoría 2: de 32 a 35 μm , tipo de daño medio; Categoría 3: mayor a 36 μm , tipo de daño alto.

Análisis estadístico

En los datos obtenidos en el Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, se comparó el número de colonias revertantes en los diferentes ensayos, utilizando Análisis de Varianza Factorial. Se tomaron como factores: el sitio de recolección de la muestra y las dosis de cada extracto.

En los diferentes ensayos de Electroforesis en gel de células individuales, la comparación de la longitud de cola en μm (daño en el ADN), también se utilizó Análisis de Varianza Factorial. Se tomaron como factores: el sitio de recolección de la muestra y las dosis de cada extracto.

En ambas pruebas, valores promedios de las interacciones entre sitio y dosis superiores a las medias del control (DMSO 50% y DMSO 1% para el Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* y Electroforesis en gel de células individuales respectivamente), se compararon utilizando la prueba t de Student para muestras independientes.

Para el análisis de los datos, se utilizó el programa Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, USA). Se consideró un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para todas las comparaciones.

Resultados

Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*

Los ensayos fueron realizados a partir de los extractos de agua cruda, tratada con sulfato de aluminio y clorada, en épocas de lluvia y seca mediante el ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* con la cepa TA 100, en la cual se produce la reversión a his⁺ por sustitución de bases.

La actividad mutagénica obtenida en los extractos de agua cruda, tratada con sulfato de aluminio y clorada, en época seca, en presencia y ausencia de activación metabólica, no fue significativa, puesto que el IM fue < 2 con respecto al control negativo DMSO 50% (Tabla 1, figura 1).

Los resultados obtenidos a partir de los extractos de agua cruda y agua tratada con sulfato de aluminio en época de lluvia revelan que a medida que se incrementan las dosis, la actividad mutagénica aumenta significativamente, pero con una velocidad que no es lineal, este efecto de dosis ($p < 0.001$) indica que el incremento del IM no es gradual. De otro lado, al igual que lo obtenido en época seca, hubo ausencia de actividad mutagénica del extracto de agua clorada en época de lluvia con y sin activación metabólica; esto se evidencia en el número de revertantes por plato, el cual permanece por debajo del control negativo, con $\text{in IM} < 2$, pese al incremento de dosis. (Tabla 2, figura 2).

Tabla 1. Resultados de la actividad mutagénica de tres experimentos independientes expresada como la $\bar{X} \pm$ la DS, del número de colonias revertantes e índice mutagénico (IM) en *Salmonella typhimurium*, cepa TA 100, con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica, expuesta a diferentes dosis de extracto total, expresado en mL de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en época seca, en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada.

Tratamientos	S9	0.18 L		0.37 L		0.56 L		0.74 L		0.93 L	
		$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM
DMSO 50%	+	101±4									
	-	101±4									
2-Aminofluoreno 10 µg/caja	+	1660±73									
	-	2443±85									
Agua cruda	+	89±7	0.8	105±3	1	125±3	1	133±4	1	145±5	1
	-	96±2	1	104±5	1	121±5	1	124±5	1	133±6	1
Agua tratada con sulfato de aluminio	+	72±5	0.7	72±3	0.7	76±5	0.8	78±8	0.8	102±15	1
	-	60±4	0.3	62±10	0.3	67±8	0.7	64±6	0.6	73±6	0.7
Agua clorada	+	89±7	0.8	105±3	1	125±3	1	133±4	1	145±5	1
	-	96±2	1	104±5	1	121±5	1	124±5	1	133±6	1

IM= índice mutagénico: relación entre el número de colonias revertantes producidas por la dosis de tratamiento y el Control negativo.

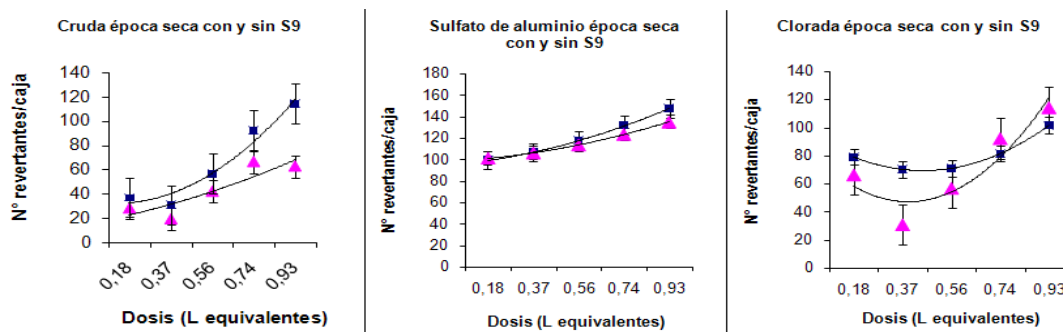


Figura 1. Actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium*, cepa TA 100, con (■) y sin (▲) activación metabólica (S9), expuesta a diferentes dosis de extracto total, expresado en L de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en época seca, en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada. La mutagenicidad se calculó con base en el número de colonias revertantes/caja con respecto al control negativo (Dimetil Sulfoxido 50%, 101 colonias revertantes/caja).

Tabla 2. Resultados de la actividad mutagénica de tres experimentos independientes expresada como la $\bar{X} \pm$ la DS, del número de colonias revertantes e índice mutagénico (IM) en *Salmonella typhimurium*, cepa TA 100, con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica, expuesta a diferentes dosis de extracto total, expresado en mL de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en época de lluvia, en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada.

Tratamientos	S9	0.18 L		0.37 L		0.56 L		0.74 L		0.93 L	
		$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM	$\bar{X} \pm DS$	IM
DMSO 50%	+	101±4									
	-	101±4									
2-Aminofluoreno 10 µg/caja	+	1660±73									
	-	2443±85									
Agua cruda	+	239±8	2	399±6	4	501±7	5	969±14	10	1035±43	10
	-	329±7	3	372±7	4	844±11	8	1589±48	15	1845±75	18
Agua tratada con sulfato de aluminio	+	230±8	2	433±9	4	606±10	6	1440±67	14	1643±76	16
	-	219±8	2	273±7	3	429±9	4	1611±75	16	1845±74	17
Agua clorada	+	23±9	0.2	31±2	0.3	24±9	0.2	29±2	0.3	31±5	0.3
	-	53±8	0.5	33±16	0.3	33±16	0.3	28±8	0.3	30±6	0.3

IM= índice mutagénico: relación entre el número de colonias revertantes producidas por la dosis de tratamiento y el Control negativo.

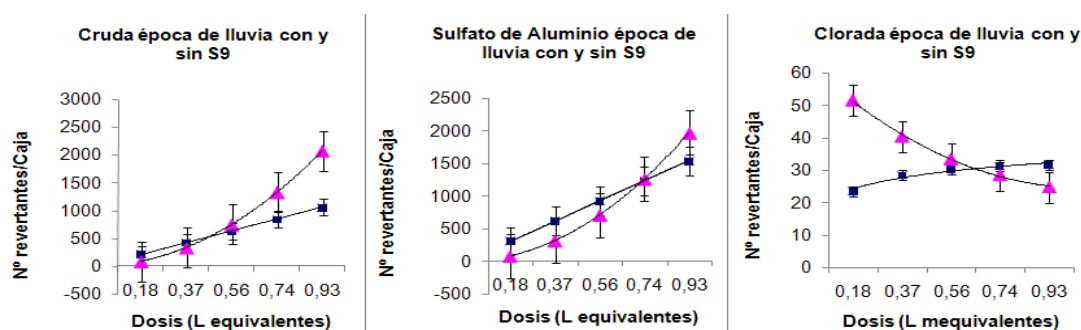


Figura 2. Actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium*, cepa TA 100, con (■) y sin (▲) activación metabólica (S9), expuesta a diferentes dosis de extracto total, expresado en mL de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en época de lluvia, en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada. La mutagenicidad se calculó con base en el número de colonias revertantes/caja con respecto al control negativo (Dimetil Sulfoxido 50%, 101 colonias revertantes/caja).

Electroforesis en gel de células individuales

En esta prueba, los datos de las épocas seca y de lluvia, se analizaron por separado debido a las diferencias encontradas (figura 3).

Las tabla 3 - 4 y figura 4, corresponden a la genotoxicidad de los extractos de agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada, en épocas seca de lluvia y respectivamente. En ellas, se puede observar como a medida que incrementan las dosis disminuye la viabilidad de las células en los tres extractos. Sin embargo, ésta no sobrepasa el 50%, lo que sugiere, que este porcentaje de células pueden estar acumulando daño y en consecuencia, presentar alteraciones en la fisiología celular.

Respecto al tipo de daño, se observa que para el extracto de agua cruda, todas las dosis representan un tipo de daño alto (categoría 3). El extracto de agua tratada con sulfato de aluminio, con dosis equivalentes a 0,093 y 0,18 L, aproximadamente el 94% de las células no presentan daño. En la dosis equivalente a 0,28 L el mayor porcentaje de células dañadas se presenta en la categoría de daño 2 o daño medio. Finalmente las dosis equivalentes a 0,37 y 0,46 L, el mayor porcentaje se concentró en la categoría de daño 3 o daño alto. Lo anterior sugiere que a medida que se incrementa la dosis de extracto, el daño en el ADN es mayor y por tanto la longitud de cola. Para el caso del extracto de agua clorada, todas las dosis presentan su mayor porcentaje de células dañadas en la categoría de daño 3 o daño alto.

Las dosis que muestran el porcentaje más alto de células dañadas, son las equivalentes a 0,37 y 0,46 L, las cuales presentan la categoría de daño 3 o daño alto. Tanto en los extractos de agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada, todas las células están en esta categoría de daño en todas sus dosis.

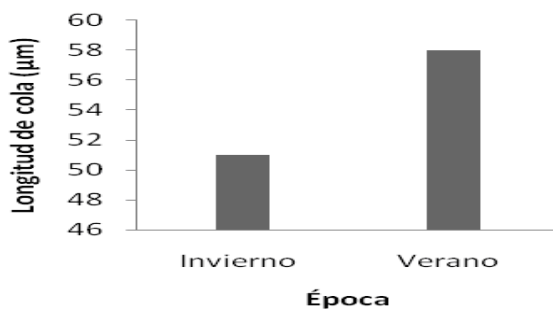


Figura 3. Genotoxicidad en linfocitos humanos, de extractos obtenidos en la planta de tratamiento en época seca y en época de lluvia.

Tabla 3. Resultados de la genotoxicidad (longitud de cola, μm) de tres experimentos independientes, en linfocitos humanos, expuestos a diferentes dosis de extracto total, expresado en mL de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en época seca, en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada.

Tratamiento (mL)	Cruda				Aluminio				Clorada												
	$\bar{X} \pm DS$	Categoría del daño			$\bar{X} \pm DS$	Categoría del daño			$\bar{X} \pm DS$	Categoría del daño											
		0	1	2		3	0	1		2	3	0	1	2	3						
DMSO 1%	23 \pm 2			0	92	23 \pm 2				92	23 \pm 2					92					
0.093	29 \pm 3	50	21	2	7	37,5	86	53 \pm 8	1	0	0	79	98,8	83	68 \pm 15	1	5	0	74	99	86
0.18	29 \pm 4	46	16	8	10	42,5	82	65 \pm 3	0	0	0	80	100	80	79 \pm 17	2	2	0	76	98	86
0.28	34 \pm 4	50	21	2	7	37,5	80	73 \pm 4	0	0	0	80	100	78	88 \pm 9	0	0	0	80	100	81
0.37	54 \pm 4	0	0	0	80	100	80	82 \pm 2	0	0	0	80	100	75	89 \pm 10	0	1	0	79	100	80
0.46	59 \pm 3	0	0	0	80	100	76	95 \pm 3	0	0	0	80	100	73	85 \pm 12	0	1	0	79	100	81

Todos los valores provienen de 600 datos, obtenidos de tres experimentos independientes. Los rangos para los tipos de daño, se obtuvieron de la siguiente manera: de 0 a 27 μm , tipo de daño 0 = no daño; de 28 a 31 μm , tipo de daño 1= daño bajo; de 32 a 35 μm , tipo de daño 2= daño medio y mayor a 36 μm , tipo de daño 3= daño alto.

Tabla 4. Resultados de la genotoxicidad (longitud de cola, μm) de tres experimentos independientes, en linfocitos humanos, expuestos a diferentes dosis de extracto total, expresado en mL de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en época de lluvia, en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada.

Tratamiento (L)	Cruda				Aluminio				Clorada												
	$\bar{X} \pm DS$	Categoría del daño			$\bar{X} \pm DS$	Categoría del daño			$\bar{X} \pm DS$	Categoría del daño											
		0	1	2		3	0	1		2	3	0	1	2	3						
DMSO 1%	23 \pm 2				0	92	23 \pm 2				92	23 \pm 2					92				
0.093	72 \pm 10	0	0	0	80	100	86	24 \pm 3	75	5	0	0	6,3	90	54 \pm 11	0	8	0	72	100	88
0.18	74 \pm 8	0	0	0	80	100	83	24 \pm 4	74	1	4	1	7,5	89	63 \pm 12	0	1	2	77	100	86
0.28	74 \pm 9	0	0	0	80	100	80	32 \pm 5	16	34	12	18	80	85	61 \pm 10	0	4	0	76	100	83
0.37	78 \pm 6	0	0	0	80	100	75	35 \pm 4	1	11	13	55	99	83	63 \pm 6	0	1	0	79	100	75
0.46	79 \pm 6	0	0	0	80	100	73	41 \pm 4	0	0	4	76	100	80	72 \pm 11	0	0	0	80	100	75

Todos los valores provienen de 600 datos, obtenidos de tres experimentos independientes. Los rangos para los tipos de daño, se obtuvieron de la siguiente manera: de 0 a 27 μm , tipo de daño 0 = no daño; de 28 a 31 μm , tipo de daño 1= daño bajo; de 32 a 35 μm , tipo de daño 2= daño medio y mayor a 36 μm , tipo de daño 3= daño alto.

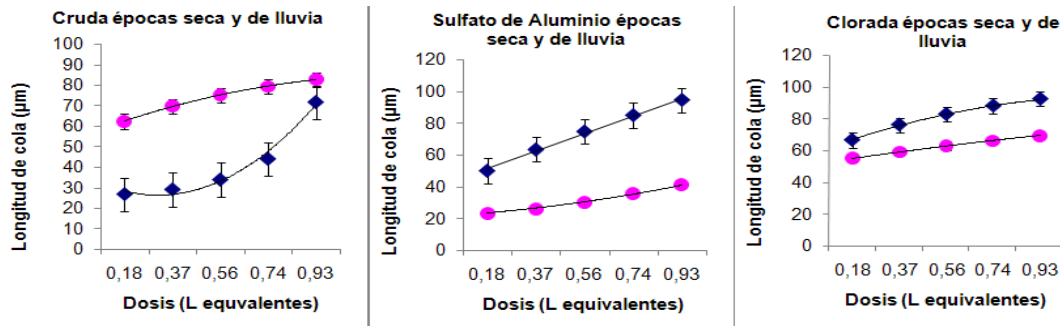


Figura 4. Genotoxicidad (longitud de cola μm) en linfocitos humanos, expuestos a diferentes dosis de extracto total, expresado en mL de agua equivalentes, obtenidos en la planta de tratamiento en épocas seca (◆) y de lluvia (●), en tres sitios de muestreo: agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada. La genotoxicidad se calculo con base en la longitud de cola (μm) con respecto al control negativo (Dimetil Sulfóxido 1%).

Discusión y conclusiones

Este estudio evaluó la mutagenicidad y genotoxicidad in vitro de extractos obtenidos a partir de aguas antes y después de varios procedimientos de potabilización (agua cruda, agua tratada con sulfato de aluminio y agua clorada) en una planta de tratamiento del departamento de Antioquia en épocas seca y de lluvia.

El test de mutagenicidad con *Salmonella typhimorium* en la cepa TA100, evidenció que la actividad mutagénica de los extractos de agua cruda, tratada y clorada en presencia y ausencia de activación metabólica, para época seca no fue significativa, ya que el IM fue < 2 , lo que indica que el número de revertantes por caja de estos extractos fue similar al obtenido en el control negativo (DMSO 50%). Contrario a lo anterior, en estos extractos obtenidos en época de lluvia, la actividad mutagénica fue significativa, evidenciando un IM > 2 , presentando efecto de dosis. Estos resultados pueden deberse a mutágenos provenientes de desechos industriales, domésticos y agrícolas (Komulainen H. 2004; Watanabe et al., 2003; Bolognesi C. Et al., 2003; Thomas K. et al., 2001) y a la formación de metabolitos secundarios entre el material orgánico e inorgánico del agua y el sulfato de aluminio (Yuan J. et al., 2005; Loper JC. et al., 1978)

De otro lado, el extracto de agua clorada bajo las condiciones anteriormente descritas, no presentó actividad mutagénica significativa, probablemente porque contiene mutágenos que no son detectados por la cepa utilizada (TA100) (Maron DM. et al., 1983). Estos resultados también pueden ser atribuidos a la toxicidad del extracto de agua clorada tanto en época seca como en época de lluvia, lo cual inhibe el crecimiento bacteriano.

De lo anterior se puede concluir que el agua potable de esta planta de tratamiento, la cual abastece a 1.5 millones de habitantes aproximadamente, no contiene mutágenos que causen mutación en el ADN por sustitución de bases.

En la prueba de Electroforesis en gel de células individuales, en general, se encontró daño genético significativo con respecto al control negativo con los extractos obtenidos en los tres sitios de muestreo (figura 4) en ambas épocas (lluvia y seca). También se evidencia un mayor daño genético producido por el extracto obtenido de agua cruda, durante la época de lluvia, debido a que en esta época, el agua arrastra gran cantidad de compuestos genotóxicos provenientes de desechos industriales, domiciliarios, agrícolas, entre otros (Komulainen H. 2004; Watanabe et al., 2003; Bolognesi C. Et al., 2003; Thomas K. et al., 2001).

La genotoxicidad de los extractos obtenidos de aguas tratadas con sulfato de aluminio y cloro, en ambas épocas fue significativa, esto se debe a la formación de metabolitos genotóxicos, producidos durante el tratamiento de purificación del agua. De esta manera, se puede tener una idea de las proporciones de daño acumulativo que actualmente tiene un adulto, el cual ingiere aproximadamente 250mL/vaso de agua al día. Sumado a esto, vivimos en un medio en el que continuamente estamos expuestos a diferentes tipos de sustancias que son altamente mutagénica y genotóxicas no solamente contenidas en la dieta, sino también en el ambiente.

En conclusión la prueba Electroforesis en gel de células individuales, evidencia que los procesos de potabilización del agua para consumo humano, pueden generar compuestos genotóxicos que causan daño en el ADN, lo cual puede conllevar a procesos degenerativos como el cáncer (Racz, G. et al., 2004).

Este estudio y acorde con otros realizados previamente, se puede determinar que los procesos convencionales de purificación no son 100% efectivos para remover contaminantes químicos; por tal razón es importante continuar realizando este tipo de investigaciones con el fin de plantear alternativas que contribuyan a la disminución de la exposición, ya que en la actualidad están en aumento diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades causadas por alteraciones genéticas.

Perspectivas

Evaluar actividad mutagénica de extractos obtenidos a partir de agua cruda y clorada en organismos eucariotas y utilizando un panel de cepas bacterianas que detecten diferentes tipos de mutaciones, por ejemplo la cepa TA 98, la cual detecta mutación por ganancia de bases.

Evaluar actividad mutagénica y genotóxica de aguas domiciliarias abastecidas por esta planta de tratamiento, con el fin de conocer si se generan mutágenos en el recorrido desde la planta hasta los domicilios.

Identificar los mutágenos presentes en los extractos utilizados, con el fin de conocer su origen y establecer la relación que existe entre estos y diferentes tipos de cáncer.

Incentivar a las entidades encargadas de los procesos de potabilización del agua de consumo humano, a que incluyan pruebas de mutagenicidad y genotoxicidad en los procesos de potabilización de aguas.

Bibliografía

Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides F, Partanen T, Carrato A. 2002. Occupational exposure to organic solvents and k- ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 23:101-106.

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association, Washington, DC.

Aruoka S.,Yamanaka S, Yamamoto Y. 1985. Mutagenic activity in organic concentrate from Nihitakase River water in Kyoto City and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography. *Water Res*, 19:249-256.

Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mut Res*, 543:251-272.

Bull RJ, Birnbaum LS, Cantor KP, Rose BJ. 1995. Butterworth B.E., Pegram R. and Tuomisto J. Symposium Overview. Water chlorination: essential process or cancer hazard. *Fundamental and Applied Toxicology*, 28:155-166.

Cabello G., Valenzuela M., Vilaxa A., Duran V., Rudolph I., Hrepic N., and Calaf C. 2001. A rat mammary tumor model induced by organophosphorous pesticides paration and malation, possibly through acetylcholine erase inhibition. *Environ. Health Perspectives*, 109(5): 471-479.

Calderon RL. 2000. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water, Food. *Chem. Toxicol*, 38:13-20.

Carrero E, Bugliosi E, Meucci L, Baiocchi C, Gilli. 2000. Biological drinking water treatment processes, with special referent to mutagenicity. *Water Research*, 34: 3042-3054.

- Clonfero E, Montini R, Venier P, Levis A. 1989. Release of mutagens from finished leather. *Mut Res*, 226:229-233.
- Culp SJ, Taylor DX, Sheldon WG, Goldstein L.S and Beland F.A. A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo (a) pyrene in a 2 years bioassay. *Carcinogenesis*. 1998;19:117-124.
- Day RP. 1972. Basophil leukocyte separation from human peripheral blood: technique for their isolation in high purity and high yield. *Clin Allergy*, 2: 205-212.
- Delfino R, Rashmi Sinha, Cynthia Smith, John West, Edward White, Henry J. Lin, Shu-Yuan Liao, Jason S.Y. Gim, Hoang L. Ma, John Butler, Hoda Anton-Culver. Breast cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis*. 2000;21:607-615.
- De Flora S, Balansky R, Gasparini L, Camoirano A. Bacterial mutagenicity of cigarette smoke and its interaction with ethanol. *Mutagenesis*. 1995;10:47-52.
- De la Cruz ER, Huaman JO. Formación de hidrocarburos policíclicos aromáticos y del 3, 4 benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento. Tesis. Universidad Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2002.
- Dipper A, Bigger C. Mechanism of action of food – associated polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Mut Res*. 1995;259:263-76.
- Elfstrom Broo A., Berghult B., Hedberg T. Drinking water distribution—the effect of natural organic matter (NOM) on the corrosion of iron and copper, Water. *Sci. Technol*. 1999;40:17–24.
- Fallon RD, Fliermans CB. Formation of nonvolatil mutagens by water chlorination persistence and relationship to molecular weight of organic material in water. *Chemosfera*. 1980;9:385-391.
- Felton J, Jagerstad M, Knize K, Skog K, Nagao M, Sugimura T. *Food Borne Carcinogens Heterocyclic Amines*. Wiley, Chichester, England. 2000.
- Felton J, Knize M, Malfatti Felton J, Kulp K, Knize M, Malfatti, Salmon C. Human Exposure to Heterocyclic Amine Food Mutagens/Carcinogens: Relevance to Breast Cancer. *Env. Mol. Mutagen*. 2002;39(2-3):112-119.
- García Villanova RJ, Garcia C, Gómez A, García MP, Ardanuy R. Formation, evolution and modeling of trihalomethanes in the drinking water of a town: IY at the municipal treatment utilities. *Wat Res*. 1997;31(6):1299-1308.
- Giver R, Wong R, Moore I, Pallavicini M. Dermal Benzene and Trichloroethylene induce Aneuploidy in immature hematopoietic in vivo. *Env. Mol Mutagen*. 2001;37: 185-194.

- Godoy W, Albano R, Moreas E, Alvares P, Nunes R, Saito E, Higa C, Filho I, Cruel C, Lang M, Ribeiro L. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in humanoesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis*. 2002;23:611-616.
- Godschalk R, Nair F, van Schooten A, Risch P, Drings K, Kayser H, Dienemann, Bartsch H. Comparison of multiple DNA adduct types in tumour adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis*. 2002;23:2081-2086.
- Hamed S, LaRue H, Hovington H, Girard J, Jeannotte L, Latulippe E, Fradet I. Accelerated Induction of Bladder Cancer in Patched Heterozygous Mutant Mice. *Cancer Res*. 2004;64:1938-1942.
- Henderson RF. Special differences in the metabolism of benzene. *Env Health Perspect*. 1996;(104 /Supp 6):1399-1404.
- Hofer M, Shuker L. ILSI Europe Workshop on Assessing Health. Risks from environmental exposure to chemicals: the example of drinking water. Summary Report, Food Chem. *Toxicol*. 2000;38:3-12.
- Holmbom BR, Voss RH, Mertimer RD, Won A. Isolation and identifications in an Ames mutagenic compound present in Kraft chlorination effluents. *Tappi*. 1981;64: 172-174.
- Hung R, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Porru S. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004;25:973-978.
- Izzotti A, Balansky R, Blagoeva P, Mircheva Z, Tulimiero L, Cartiglia C, De Flora S. DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J*. 1998;12(9):753-758.
- Kavanaugh MC, Trussell AR, Cromer J, Trusser RR. An empirical kinetic model of THM formation: application to meet the proposed THM standars. *J. Am. Wat. Works Assoc*. 1980;72:578-582.
- Kleinsasser H, Norbert E, Kastenbauer R, Weissacher H, Muenzenriedes K. Phthalates Demostrare Genotoxicity on Human mucosa of the Upper Aerodigestive Tract. *Env. Mol Mutagen*. 2000;53:9-12.
- Komulainen H. Experimental cancer studies of chlorinated by-products. *Toxicology*. 2004;198:239-248.
- Jäger I, Hafner C. and Schneider S. Mutagenity of different textile dye products in Salmonella typhimurium and mouse lymphoma cell. *Mut. Res*. 2004;561(1/2): 35- 44.

- Lawther PD, Commins BT, Waller RE. A study of the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in gas works refort houses. *Brit J ind. Med.* 1965;22:13.
- Lear C, Klinge M, Belinsky S. p16INK4a and β -catenin alterations in rat liver tumors induced by NNK. *Carcinogenesis.* 2001; 22:461-466.
- Loper JC, Lang DR, Schoeny RS, Richmond BB, Gallagher PM, Smith CC. Residue organic mixtures from drinking water show in vitro mutagenic and transforming activity. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1978;9:919-938.
- Lubet R, Huebne Kr, Fong L, Altieri D, Steele v, Kopelovich L, Kavanaugh C, Juliana M, Soong S, Grubbs C. 4-Hydroxybutyl (butyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancers in mice: characterization of FHIT and survivin expression and chemopreventive effects of indomethacin. *Carcinogenesis.* 2005;26:571-578.
- Malfatti M, Ubick L, and Felton J. The Impact of glucuronidation on the bioactivation and DNA adduction of the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine in vivo. *Carcinogenesis.* 2005;26(11):2019-2028.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983;11:172-215.
- Marston C, Pereira C, Ferguson J, Fisher K, Hedstrom O, Dashwood WM, Baird. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) on the tumor initiation, PHA – DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PHA in mouse epidermis. *Carcinogenesis.* 2001;22:1077-1086.
- Mitacek E, Brunnemann K, Hoffmann D, Limsila L, Suttajit M, Martin N, Caplan L. Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand. *Carcinogenesis.* 1999;20:133-137.
- Monarca S., Richardson S.D., Feretti D., Grottole M., Thruston A.D., Zani C., Navazio G., Ragazzo P., Zerbini I., Alberti A. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002;21:309-318.
- Morelli M. Industry viewpoint on thresholds genotoxic carcinogenic. *Toxicol Pathol.* 2000;28(3): 396-404.
- Morris RD. Drinking water and cancer. *Environ Health Perspect.* 1995;103(8):225-231.
- Nagao M, Sugimura, T. Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines. *John Wiley & Sons Ltd, West Sussex,* 2000;50:31-72.

- Ohe T.. Quantification of mutagenic / carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trip- P1, Trip – P2 and Phip contributing highly to genotoxicity of river water. *Mutat. Res.* 1997;393(1-2):73-79.
- Olaya-Contreras P, Rodriguez-Villamil J, Posso-Valencia HJ, Cortez JE. Organochlorine exposure and breast cancer risk in Colombian women. *Cad Saude Publica.* 1998. 14(suppl 3):125-132.
- Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bueled heads and carp. *Environ Mol Mutagen*, 26:345-56.
- Paustenbach DJ, Bass Rd, Price P. 1993. Benzene toxicity and risk assessments, 1972-1992: Implications for future regulation. *Environ Health perspect*, 101(6):177-200.
- Phillip M, Nesnow S, Davis C. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. *Mutation Res.* 1999;426:143-145.
- Phillip L, Grover, Martin F. The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2002;23:1095-1102.
- Pollack N, Cunningham A, Rosenkrantz H. Persistence of chemicals and their carcinogenic risks to human. *Mutation Res.* 2003;58:81-91.
- Porter W, Jalger J, Carlson I. Endocrine, immune and behavioral effects of aldicarb (carbamate), atrazine (Triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at ground water concentrations. *Toxicol.Ind.Health.* 1999.;15(1-2):133-150.
- Racz, G., Sujbert, L., Bocsi, J., Szende, B. Rapid communication: water disinfection by-products enhanced apoptotic activity in human lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2004; 67 (17):1315-1319.
- Randerath K, Randerath E, Zhou G, Supunpong N, He L, Mc Donald T, Donnelly K. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lakes sediments as assessed by three different methods. *Env Mol Mutag.* 1999;33: 303-312.
- Reh B, DeBord G, Butle M, Reid M, Mueller C, and Fajen J. O⁶-methylguanine DNA adducts associated with occupational nitrosamine exposure. *Carcinogenesis.* 2000; 21:29-33.
- Rehana Z, Malik A, Ahmad M. Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to pesticide pollution in the river between Kachia to Kannauj (U.P), India. *Mutation Res.* 1995. 343:137-144.
- Rehana Z, Malik A and Ahmad M. Genotoxicity of the Ganges water at Naroa (U.P), India. *Mutation Res.* 1996;367:187-193.
- Ruey-Shin J. Preparation, properties and sorption behavior of impregnated resins containing acidic organophosphorus extractants. The Proceedings of the National. *Science Council.* 1999; 23(3):353-364.

- Rundle A, Tang D, Hibshoosh, Estabroo, Schnabel F, Cao W, Grumet S, Perera F. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21:1281-1289.
- Rundle A, Tang D, Hibshoosh H, Schnabel F, Kelly A, Levine R, Zhou J, Link B, Perera F. Molecular Epidemiologic Studies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts and Breast Cancer. *Env Mol Mutagen*. 2002;39 (2/3):201-208.
- Sachse C, Smith G, Wilkie M, Barrett J, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop T, Wolf C. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2002;23:1839-1850.
- Scalan R. Formation and occurrence of Nitrosamines in food. *Cancer Research*. 1983;43:2435-40.
- Schut H, Cummings D, Lin E, Daniel F. ³²P-postlabelling analysis of DNA adduct formation of the drinking water mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl) - 5-hydroxy-2 (5H)-Furanone (MX). *Environ. Mol. Mutagen*. 1997;17:65-72.
- Sierra Torres CH, Salazar NC, Hoyos LS, Zuleta M, Whorton EB, Au WW. In vitro and in vivo genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. *Mutation Res*. 1998;415:59-67.
- Singh NP, McCoy M, Tice R, Edgard E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-191.
- Snyderwine E, Roller P, Adamson R, Sato S, Thorgeirsson S. Reaction of N-hydroxylamine and N-acetoxy derivatives of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline with DNA. Synthesis and identification of N-(deoxyguanosin-8-yl-) IQ, *Carcinogenesis*. 2003;9:1061-1065.
- Snyderwine E, Turesky R, Turteltaub W, Davis C, Sadieh N, Schut H, Nagao M, Sugimura T, Thorgeirsson U, Adamson R, Thorgeirsson S. Metabolism of food-derived Heterocyclic Amines in nonhuman primates. *Mut. Res*. 1997;376:203-10.
- Spregelhalder B, Elsenbrand G, Preussmann R. Occurrence of volatile nitrosamines in food, a survey of the west German market. In: E.A Walker, L Gnciute Castegnaro M and Borzsoyi (eds), N-nitroso compounds: analysis, formation and occurrence, *IARC*. 1980;1:467-479.
- Thomas K, Hurst M, Matthiessen P, Sheahan D, Williams R. Toxicity characterisation of organic contaminants in stormwaters from an agricultural headwater stream in south east England. *Wat. Res*. 2001. 35:2411-2416.
- Toraason M, Butler M, Ruder A, Forrester C, Taylor L, Ashley D, Mathias P, Marlow K, Cheever K, Krieg E, Wey H. Effect of perchloroethylene, smoking, and race on oxidative DNA damage in female dry cleaners. *Mut. Res*. 2003. 539, 9-18.

- Travis LB, Li Cy, Zhang ZN, Li DG, Yin SN, Chow WH, Li LG, Dosemeci M, Blot W, Fraumeni J. Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene exposed workers in China. *Leuk lymphoma*. 1994;14:91-102.
- Urano Y. Mutagenic actives of exhaust gas and ash from sludge incineration plants. *Sci. Total Environ*. 1998;215(1-2):41-49.
- USEPA - U.S. Environmental Protection Agency, 2000. Exposure and Human Health Reassessment of 2, 3, 7, 8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and Related Compounds. Part I: Estimating Exposure to Dioxin-Like Compounds. Volume 2: Sources of Dioxin-Like.
- Vargas V, Motta V, and Henriques J. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mut Res*. 1993;319: 31-45.
- Wagner ED, Marengo MS, Plewa MJ. Modulation of the mutagenicity of heterocyclic amines by organophosphate insecticides and their metabolites. *Mutation Res*. 2003;536:103-115.
- Watanabe T, Morisawa T, Mizuno T, Nukaya H, Terao Y, Tada A, Sawanishi H, Ohe T, Wakabayashi K, Hirayawa T, Terao Y. Levels and behavior of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens in the effluent of a sewage treatment plant. *Mut. Res*. 2003;534:123-132.
- Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Tada A, Sawanishi H, Ohe T, Wakabayashi K, Sugimura T. Synthesis of 2- phenylbenzo—triazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in waters from rivers in Japan. *Mut Res*. 2001;498:107-115.
- White P. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mut Res*. 2002;515:85-98.
- WHO. Revision of the WHO Guidelines for Drinking water Quality. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 1996.
- Whysner J, Reddy M, Roos P, Mohan M, Lax E. Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mut Res*. 2004;566:99-130
- Winisberg M, Van Der Gaag M. In vivo detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory. *Sci Total Environ*. 1992. 121:95 -108.
- Yan G, Kim S, Lee E, Cheon H, Chang S, Kang D, Choi Y, Lee S, and Jang J. Source of polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure In Non-Occupationally Exposed Koreans. *Envi. Mol. Mutagen*. 2003;42(4):250-258.
- Yan J, Wang L, Fub P, Yu H. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mut Res*. 2004;557:99-108.

- Yuan J, Wu XJ, Lu WQ, Cheng XL, Chen D, Li XY, Liu AL, Wu JJ, Xie H, Stahl T, Volker MS. Chlorinated river and lake water extract caused oxidative damage, DNA migration and cytotoxicity in human cells. *Int. J. Hyg. Environ-Health*. 2005;208:481-488.
- Zuleta M, Meléndez I. Genotóxicos y carcinógenos en aguas. *Actualidades Biológicas* 2001;23(74):83-93.
- Zuleta M, Valencia C, Posada L, Muñetón C, Arango O, Meléndez I. Mutagen Formation in Three Popular Colombian Cooked Foods Effect of Supplemental Creatine and Corn Brand. *Environ Mol Mutagen*. 1994; 23(23):77.
- Zuleta M, Salazar J, Adelaida G. Mutagenicidad de cinco herbicidas en Salmonella typhimurium, *Rev. Latinoam. Genet*. 1990;46:321-328.

Producto 4. Artículo

Evaluación genotóxica de la interacción entre mezclas binarias de los mutágenos: Benzo(a)pireno, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5h-pirido[4,3-b]indol y 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona, en el ADN de linfocitos humanos.

Evaluación genotóxica de la interacción entre mezclas binarias de mutágenos en linfocitos humanos

Genotoxic evaluation of the interaction between binary mixtures of mutagens in human lymphocytes

Isabel C Ortiz^{1*}, Carlos A Peláez², Luz Yaneth Orozco³ y Margarita Zuleta†

¹ Docente, Universidad Pontificia Bolivariana. ² Docente, Universidad de Antioquia. ³Estudiante Doctorado, Universidad de Antioquia.

Laboratorio de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, UPB y laboratorio de Mutagénesis Ambiental, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.

* Correspondencia: Isabel Cristina Ortiz Trujillo. Calle 78B 72A-109, Facultad de Medicina, UPB, Campus Robledo, Medellín, tel. 4936300 ext. 854 fax 2572428,

isabel.ortiz@upb.edu.co

RESUMEN

Introducción. Muchos mutágenos que están contenidos en mezclas complejas, pueden presentar interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas. Pocos estudios investigan las interacciones entre compuestos químicos y un punto clave para abordar el problema de mezclas complejas es el desarrollo de enfoques experimentales que permitan dilucidar cuál es el agente responsable del efecto en la mezcla.

Objetivo. Evaluar *in vitro* el efecto sobre el ADN de linfocitos humanos producido por la interacción de los mutágenos puros benzo(a)pireno, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol, y 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona.

Método. Linfocitos humanos fueron expuestos a mezclas binarias de los mutágenos durante 1 hora con y sin activación metabólica. La viabilidad se evaluó con el colorante azul tripano y la genotoxicidad con el ensayo Cometa.

Resultados. Algunas mezclas no indujeron efectos citotóxicos ni genotóxicos, mientras que otras presentaron efectos antagónicos y sinérgicos significativos, efecto de dosis y efecto umbral. En general las interacciones presentaron daño genotóxico de tipo medio y gran cantidad de células dañadas. Para todas las mezclas se pudo determinar la concentración mínima en la que se observan efectos adversos y solo para algunas se determinó la concentración máxima en la cual no se observan efectos adversos.

Conclusión. Se hace un aporte importante para comprender los procesos que pueden ocurrir cuando en una mezcla hay presentes al menos dos mutágenos y se valida un modelo de análisis que permite dilucidar cuál compuesto tiene efecto sobre otro. También se demostró que, según el tipo de compuestos en la mezcla, se tendrá o no un umbral de riesgo.

Palabras clave: Sinergismo, antagonismo, genotoxicidad, ensayo Cometa alcalino, NOAEL y LOAEL.

Abstract

Introduction. Many mutagens are present contained in complex mixtures; they may exert synergistic, additive or antagonistic interactions. Few studies investigate the interactions between chemicals and the development of experimental approaches to elucidate what is the agent responsible for the effect in the mix is a key point to address the problem of complex mixtures.

Objective. To evaluate *in vitro* the effect on human lymphocyte DNA caused by the interaction of pure mutagens benzo(a)pyrene, 7,12-dimetilbenzo(a)anthracene, 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol acetate, and 3-chloro-4-(dicloromethyl)-5-hidroxy-2(5H)-furanone.

Methodology. Human lymphocytes were exposed to binary mixtures of mutagens for 1 hour with and without metabolic activation. Viability was assessed with trypan blue dye and the genotoxicity by Comet assay.

Results. Some mixtures showed no cytotoxic or genotoxic effect, others showed significant synergistic and antagonistic effects, dose effect and threshold effect. In general, the interactions showed genotoxic damage medium type and a great number of damaged cells. For all the mixtures, the minimum concentration at which adverse effects are observed (LOAEL) could be estimated, while only for some of them, it was possible to calculate the maximum concentration at which no observed adverse effect level (NOAEL).

Conclusion. This research makes an important contribution to understand the processes that can occur when at least two mutagens are present in a mixture and validates an analytical model that determines which component has an effect on another. The results also showed that depending on the type of compounds in the mixture, there will be or not a risk threshold.

Keywords: Synergism, antagonism, genotoxicity, alkaline comet assay, binary interactions, NOAEL, LOAEL,

INTRODUCCIÓN

El problema para la salud de un contaminante individual se da bajo circunstancias específicas y a una alta exposición, la mayoría de los mutágenos a los cuales estamos expuestas las personas son componentes de mezclas ambientales complejas y muchos de los cánceres humanos están asociados con la exposición a contaminantes ambientales presentes en fuentes industriales, en el agua, en alimentos, humo de cigarrillo, entre otros (1, 2). Los mutágenos contenidos en las mezclas llegan continuamente a la población y aunque estén en cantidades muy pequeñas, del orden de partes por billón (ppb) o partes por trillón (ppt) (dosis aparentemente permisibles) que no conllevan a muerte celular, generan acumulación de mutaciones (3) que de recaer en células somáticas, en genes involucrados en la regulación de la división celular (proto-oncogenes), en genes que participan en la reparación de daños en el ADN, en genes que participan en uniones celulares o en genes supresores de tumores pueden iniciar el proceso de carcinogénesis (4). Debido a la constante exposición a ambientes contaminados con mutágenos es importante entender las interacciones potenciales de los componentes de la contaminación, que pueden ser interacciones sinérgicas, antagónicas o aditivas (5-9).

En general los mutágenos llegan al organismo mezclados con otros mutágenos o material no mutagénico. Sólo conociendo este tipo de efectos se puede evaluar el riesgo para la salud humana que representa la presencia de mutágenos en diferentes ambientes. Se ha observado que diferentes combinaciones de cinco aminas heterocíclicas (HA) aumentan la producción de adenocarcinomas en el intestino de ratas (10). Se ha comprobado que los mutágenos 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona (MX) y la amina heterocíclica 2-amino-6-metildipirido(1,2-a:3'2'-d)imidazol (Glu-p-1) al estar mezcladas aumentan la mutagenicidad indirecta de Glu-p-1. Se evidenció que el cromo hexavalente mezclado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) aumenta la unión de estos compuestos con el gen P53 en células humanas de pulmón (11). En otras investigaciones se ha observado que el contenido de Benzo(a)Pireno (B[a]P) de una muestra de aire producía menos del 2% de la mutagenicidad inducida por la mezcla (12) y que mezclas complejas de compuestos aromáticos suprimieron la actividad mutagénica de B[a]P, 7,12-

dimetilbenzo(a)antraceno, (DMBA), 2-aminofluoreno y 2-acetilaminofluoreno, en Salmonella (13). Hermann (14) concluyó que varios hidrocarburos no mutagénicos aumentaron la mutagenicidad de B[a]P y que muchos PAH mutagénicos produjeron una disminución y algunas veces eliminaron la mutagenicidad de este hidrocarburo.

En compartimentos ambientales como aire, suelo, sedimentos, alimentos y agua se presentan frecuentemente mutágenos como hidrocarburos policíclicos aromáticos de los cuales son comunes el B[a]P y el Dimetilbenzoantraceno, aminas heterocíclicas del tipo acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol (Trp P1) y además en el agua de consumo se pueden encontrar los anteriores más subproductos de cloración como la furanona MX (15-20). Para la evaluación de la genotoxicidad de compuestos puros o mezclas se sugieren ensayos predictivos de la carcinogenicidad que evalúen diferentes respuestas o *end point* como electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa) dado que se ha demostrado en humanos una relación entre la exposición a diversos compuestos químicos y el proceso de carcinogénesis (21, 22).

Existen muy pocos estudios que investiguen las interacciones entre dos o más compuestos químicos y el análisis de riesgo que comprende la identificación del peligro, el análisis dosis-respuesta, análisis de exposición y caracterización del riesgo, este análisis solo se lleva a cabo para compuestos puros. Un punto clave para abordar el problema de mezclas complejas es la planeación de enfoques experimentales que orienten en la selección de estrategias que puedan relacionar exposición, genotoxicidad, citotoxicidad, blanco a evaluar y valor predictivo de los resultados. Una de las preguntas en mezclas es establecer el agente primario responsable del efecto, es necesario conocer y cuantificar que hay en la mezcla para poder evaluarla (23). El presente trabajo propone un diseño experimental que permita un acercamiento a la comprensión de los procesos que se dan entre los compuestos presentes en las mezclas complejas, de tal manera que se tenga una idea de cómo abordar el problema del análisis de riesgo para las mezclas complejas, dilucidando en cuáles de ellas se presenta o no efecto umbral y en cuáles se puede determinar los valores de NOAEL y LOAEL. Esta investigación describe la actividad genotóxica en linfocitos humanos tratados con cuatro carcinógenos puros bien conocidos, B[A]P,

DMBA, Trp-P-1 y MX, de manera individual y a partir de sus mezclas binarias, seleccionados porque han sido comúnmente identificados en matrices complejas ambientales como agua, aire y alimentos.

METODOLOGÍA

3.1 Sustancias químicas

Los mutágenos B[a]P (CAS 50-32-8), DMBA (CAS 57-97-6), MX, Trp-P1 (CAS 62450-06-0), los medios DMEM-F12 y RPMI 1640, el DMSO (CAS 67-68-5), el suero bovino fetal, la tripsina, la penicilina (CAS 69-57-8), la estreptomycin CAS 21736-83-4), el Hystopaque, los colorantes bromuro de etidio (CAS 1239-45-8) y azul de tripano (CAS 72-57-1), la agarosa de bajo punto de fusión (LM, CAS 9012-36-6), la agarosa de punto de fusión normal (NM, CAS 9012-36-6), el cloruro de sodio (NaCl, CAS 7646-14-5), el hidróxido de sodio (NaOH, CAS 1310-73-2), el detergente N Lauril sarcosinato de sodio (CAS 137-16-6), el ácido etilendiamíntetracético (EDTA, CAS 60-00-4) fueron obtenidos en Sigma Aldrich, la mezcla S9 se preparó antes de cada prueba, usando la fracción S9 de hígado de rata inducida con Aroclor 1254 (código 11-01 L.2, liofilizado, NADP reagensys "A" y "B" códigos 60.2004 y 60-201.4L) obtenido de MOLTOX-Molecular Toxicology Inc y todos los otros reactivos utilizados fueron adquiridos de Merck. Los mutágenos se disolvieron en DMSO, la concentración final de DMSO en los cultivos celulares no excedió el 1%.

Cultivo de linfocitos

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de un voluntario joven (25 años), saludable, no fumador, sin ningún tipo de tratamiento clínico, no deportista de alto rendimiento. A partir de 5.0 mL de sangre total heparinizada, obtenida en las horas de la mañana, se tomó 1.0 mL de sangre, 0.2 mL de fitohemaglutinina (PHA) y se adicionaron a 8 mL de medio RPMI-1640, suplementado con 5% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (56°C, 30 minutos), penicilina (100 U/mL),

estreptomycin (100 µg/mL) and were cultured for 48 hours at 37°C (24, 25). Then, the blood was centrifuged and the precipitated cells were deposited in a density gradient of Hystopaque. After centrifugation (2.000 rpm, 25°C, 30 min), the lymphocytes were collected and washed three times with phosphate saline buffer (PBS) (1.200 rpm, 7 min). Subsequently, the respective treatments were performed as described below.

Treatments cellular.

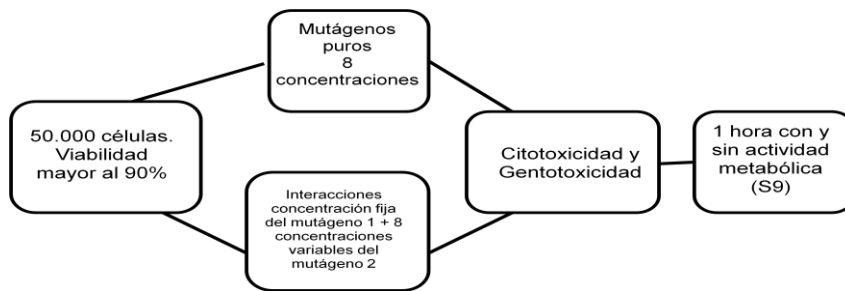


Figura 1. Diseño de los tratamientos celulares con los mutágenos puros B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX. Como control negativo se utilizó DMSO (1%) y como control positivo H₂O₂ (50 µM).

5 x 10⁴ cells were subjected to an acute exposure of 1 h, time sufficient for the action of the mutagen. In addition, each treatment was performed in the presence or absence of an exogenous metabolic system (microsomal fraction S9) (figure 1).

Cytotoxicity and genotoxicity

The concentrations used for the cytotoxicity (viability) and genotoxicity tests of the pure compounds were:

B[a]P, DMBA, Trp-P-1 and MX: 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 40, 50 and 100 µM

Negative control: RPMI-1640, PBS and DMSO (1%)

Positive control: H₂O₂ (50 µM).

Para las interacciones las concentraciones fueron:

Mutágeno fijo	Mutágeno variable
1 μM	
B[a]P	DMBA, Trp-P1, MX 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m
DMBA	B[a]P, Trp-P1, MX 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m
Trp-P1	B[a]P, DMBA, MX 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m
MX	B[a]P, DMBA, Trp-P1 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m

Ensayo de citotoxicidad y selección de concentración del compuesto fijo para las interacciones durante 1 hora de exposición.

Con el fin de evitar falsos positivos en la genotoxicidad, se tuvo en cuenta para los análisis de las interacciones aquella concentración del compuesto fijo que luego de 1 h de exposición, presentara una citotoxicidad máxima de un $70\pm 5\%$ (citotoxicidad moderada), ya que los efectos genotóxicos pueden estar asociados con citotoxicidad nula a moderada (26).

La viabilidad se determinó utilizando el colorante de exclusión azul tripano, que se basa en que las células muertas pierden la capacidad de permeabilidad selectiva y por lo tanto el colorante ingresa por difusión a ellas adquiriendo una coloración azul, en contraste, las células vivas son refringentes y selectivas al colorante. La cuantificación de la citotoxicidad se evaluó con doble ciego.

Evaluación genotóxica a través de electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa alcalino).

Una vez determinada la concentración de los compuestos puros a 1 h de exposición en la cual la citotoxicidad fuera inferior al 70%, se buscó la concentración mínima en la cual se observan efectos adversos (LOAEL) genotóxicos **común** a todos los mutágenos y se realizaron las mezclas binarias de la siguiente manera: se dejó fija la concentración correspondiente al LOAEL genotóxico común a cada uno de los mutágenos y se variaron las concentraciones del segundo mutágeno y viceversa (ver esquema anterior). Esto se realizó con el fin de dilucidar a cuál de los mutágenos se le atribuye el efecto generado en la mezcla binaria. La genotoxicidad se evaluó por medio del ensayo cometa alcalino que se basa en que los daños en el ADN nuclear generados por un agente genotóxico que no causa ligamientos cruzados, produce fragmentos de ADN de bajo peso molecular, generados por quiebres directos de cadena doble o sencilla o indirectamente por reparación por escisión incompleta o por la formación de sitios lábiles al álcali. Estos fragmentos de ADN se liberan durante el período de desenrollamiento alcalino y generan la cola del cometa durante la electroforesis. El ADN de alto peso molecular no migra y forma la cabeza del cometa, así mientras mayor sea el daño y la fragmentación generados por el compuesto genotóxico, mayor será la longitud de la cola del cometa.

Para detectar el daño en el ADN se utilizó electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa alcalino). Los parámetros validados para determinar daño evaluado a través de este ensayo son: Migración del ADN, concentración de ADN en la cola, momento de cola, momento Olive, entre otros (27). El parámetro elegido en esta investigación fue la migración del ADN (longitud de cola, μm), según metodología propuesta por Singh (28). Se tomaron 20 μL de cada suspensión celular y se mezclaron con 80 μL de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%, 37°C), en PBS libre de calcio y magnesio, con el fin de formar una suspensión de células en agarosa. 100 μL de cada suspensión se colocó en un porta objetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal (1%), luego de poner los cubreobjetos, se llevaron las placas a 4°C para permitir la solidificación de la agarosa. Al finalizar el tiempo, se retiraron los cubreobjetos y se adicionó la

tercera capa de agarosa (100 μ L de agarosa de bajo punto de fusión), de nuevo se llevaron a 4°C para su solidificación. Después de remover los cubreobjetos, las muestras se sometieron a solución de lisis recién preparada (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM de Tris, 10 g/L de N-Lauril sarcosinato de sodio y 1% de Tritón X-100 a un pH de 10, ajustado con NaOH) a 4°C, durante 1 hora. Al finalizar este tiempo, las placas se lavaron con PBS y para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión de los sitios lábiles al álcali se cubrieron con buffer de electroforesis (300 mM de NaOH y 1 mM de Na₂EDTA a pH=13) por 20 minutos. Posteriormente, se corrió la electroforesis por 30 minutos, a 25 mV (1.1 V/cm) y 300 mA. Luego, las placas fueron neutralizadas sometiéndolas a tres lavados durante 5 minutos con buffer neutralizante frío (0.4 M de Tris buffer a pH=7.5 con HCl), se fijaron con metanol y se guardaron a 4°C en un ambiente de baja humedad, hasta su lectura. Cada placa se coloreo con bromuro de etidio (BrEt, 20 μ g/mL) y se leyó utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon), con filtro verde y con un objetivo de 40X. Para cuantificar la migración del ADN (daño), se usó como parámetro de medida la longitud de cola (μ m) (29-32). El criterio para determinar daño genético fue la media del control más una desviación estándar más uno ($X \pm DS + 1$) y de acuerdo a este valor, se clasificó arbitrariamente, el tipo de daño (TD) en cinco categorías: TD=0, células sin daño (0-18 μ m); TD=1, células con daño bajo (19-37 μ m); TD=2, células con daño medio (38-56 μ m); TD=3, células con daño alto (57-75 μ m) y TD=4, células con daño total (mayor a 75 μ m). Otro parámetro que se tuvo en cuenta para los análisis de genotoxicidad fue la frecuencia de células dañadas en cada tratamiento y cada lectura se hizo con doble ciego.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados se hicieron tres experimentos independientes (33) cada uno por duplicado y de cada tratamiento se contabilizaron 80 células (40 de cada placa), para un total de 240 células por tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto para los compuestos puros como para las mezclas, se determinó homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene y para establecer la normalidad se utilizó Kolmogorov-

Smirnov. Si el comportamiento de los datos es paramétrico, se aplica Análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon, para datos no paramétricos.

Para comparar el efecto genotóxico (longitud de cola en μm) de las mezclas binarias de los mutágenos se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA) bifactorial (mezcla y concentración), tanto para 1 como para 24 h de tratamiento. Se consideraron nueve concentraciones codificadas de 0 a 8, siendo 0 la dosis correspondiente al control negativo (DMSO, 1%). Las comparaciones múltiples de medias para los mutágenos, se realizaron con la prueba de Newman-Keuls, con un $\alpha = 0.05$.

Para determinar efecto de dosis, se realizó un Análisis de Regresión simple con una $p < 0.05$.

Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Citotoxicidad y genotoxicidad

Compuestos puros.

Selección de la concentración del compuesto fijo para las interacciones.

La citotoxicidad en linfocitos humanos expuestos durante 1 h a las diferentes concentraciones evaluadas de los mutágenos B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica fue de nula a moderada (tabla 1).

Como los efectos genotóxicos pueden estar asociados con citotoxicidad nula a moderada (26), se eligió el mínimo tiempo de exposición (1 h) como parámetro para seleccionar la concentración mínima genotóxica que se usó en las interacciones. La mínima concentración en la cual se observan efectos adversos (LOAEL) genotóxicos común a los cuatro compuestos, durante los dos

tiempos de exposición, con y sin S9, fue de 1 μ M, por lo tanto, esta fue la concentración seleccionada para mantener el compuesto fijo que se utilizó en cada mezcla binaria (tabla 1).

Tabla 1. Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos tratados con B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica, durante 1 h.

Compuesto	Concentración μM	X±DS		TD		% CD		% V	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO	1%	15±3	15±2	0	0	15	13	100	98
H₂O₂	50	73±9	75±10	4	4	76	88	50	48
	0.01	16±4	27±4	0	1	10	51	100	89
	0.10	19±7	28±6	1	1	20	70	89	88
	1.00	19±3*	28±4	1	1	33	69	96	94
BP	10.00	20±1	28±3	1	1	36	70	82	97
	20.00	21±1	28±2	1	1	41	80	83	98
	40.00	22±1	28±6	1	1	45	83	91	68
	50.00	26±1	28±8	1	1	58	84	84	67
	100.00	27±4	29±5	1	1	46	89	84	67
DMBA	0.01	18±6	26±4	0	1	21	54	86	100

	0.10	18±7	26±3	0	1	23	55	75	100	
	1.00	28±6*	26±5	1	1	43	55	75	100	
	10.00	29±5	27±6	1	1	48	73	72	91	
	20.00	30±8	28±5	1	1	61	61	69	78	
	40.00	39±9	28±3	2	1	90	61	65	77	
	50.00	43±9	29±9	2	1	86	66	60	76	
	100.00	44±9	34±8	2	1	98	88	59	75	
	<hr/>									
	0.01	17±5	19±3	0	1	30	11	100	100	
	0.10	17±5	20±5	0	1	30	23	100	100	
	1.00	19±1*	20±1	1	1	40	23	100	100	
Trp-P-1	10.00	21±1	21±2	1	1	43	28	95	97	
	20.00	21±2	22±5	1	1	50	28	88	85	
	40.00	21±2	23±4	1	1	60	41	55	65	
	50.00	27±7	24±5	1	1	59	49	50	58	
	100.00	36±8	37±6	1	1	80	96	0	0	
	<hr/>									
	0.01	17±4	26±3	0	1	9	70	100	100	
	0.10	17±4	27±5	0	1	11	78	100	95	
MX	1.00	19±1*	28±2	1	1	23	78	95	82	

10.00	20±2	29±3	1	1	30	85	93	81
20.00	21±1	29±2	1	1	28	86	91	80
40.00	23±2	30±5	1	1	41	87	91	79
50.00	24±3	32±6	1	1	45	95	90	79
100.00	26±4	32±5	1	1	61	95	89	78

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado. Se considera que una célula está dañada a partir de 19 μm ($X \text{ control} + 1\text{DS} + 1$).

$X \pm \text{DS}$: Longitud de cola \pm desviación estándar

TD: Tipo de daño

% CD: Porcentaje de células con daño

% V: Porcentaje de viabilidad *: $p < 0.001$

Mezclas binarias.

No se observó ningún efecto a 1 h de exposición y sin actividad metabólica cuando los mutágenos B[a]P, DMBA, Trp-P-1 permanecieron a una concentración fija de 1 μM y se mezclaron con distintas concentraciones de la furanona MX, lo mismo ocurrió cuando el MX está fijo y se mezcló con cualquiera de los dos hidrocarburos a las concentraciones variables analizadas. Tampoco se observó efecto con actividad metabólica, cuando los dos hidrocarburos permanecieron a una concentración constante y el MX a concentraciones variables, igual que cuando están a una concentración fija Trp-P-1 o MX y B[a]P es variable (datos no mostrados). En conclusión, ninguno de los dos hidrocarburos tuvo efecto con la furanona (MX), independiente de cual mutágeno permaneciera variable a 1 h de exposición con y sin S9, excepto la mezcla MX y DMBA con concentración variable y con actividad metabólica.

Citotoxicidad

La citotoxicidad producida por algunas de las mezclas binarias fue superior al 40%, es decir una citotoxicidad desde moderada-alta a total. Con y sin actividad metabólica se observó que las interacciones más tóxicas se presentaron entre los dos hidrocarburos, independiente de cuál esté fijo, a una concentración del compuesto variable aproximadamente desde 10 μM . La mezcla de la amina (Trp-P-1) con el DMBA y con la furanona fue citotóxica cuando la amina presentó una concentración variable y se observó a partir de 50 μM sin actividad metabólica; en cambio, con actividad metabólica, se presentó citotoxicidad de esta misma mezcla, solo cuando el hidrocarburo es variable o cuando la furanona está fija. (tabla 2).

Tabla 2. Citotoxicidad de las mezclas binarias en linfocitos humanos expuestos durante 1 h con y sin actividad metabólica.

Tiempo	S9	Mezcla	NOAEL del compuesto variable (μM)	LOAEL del compuesto variable (μM)
1 h	-	B[a]P+DMBA	1	10
		DMBA+Trp-P-1	40	50
		MX+Trp-P-1	40	50
		DMBA+B[a]P	10	20
	+	B[a]P+DMBA	1	10
		DMBA+BP	20	40
		Trp-P-1+DMBA	10	20
		MX+Trp-P-1	40	50

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado.

NOAEL: Máxima concentración en la cual no se observan efectos adversos citotóxicos.

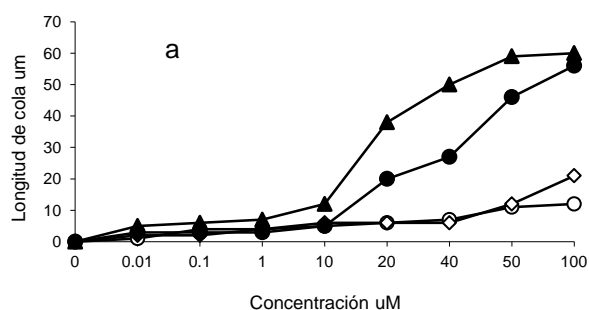
LOAEL: Mínima concentración en la cual se observan efectos adversos citotóxicos.

Genotoxicidad

En la tabla de 3 sólo se presentan las mezclas binarias en las cuales hubo interacción con y sin actividad metabólica, que se describirán a continuación.

Interacción luego de 1 hora de exposición

Algunas de las mezclas presentaron interacción genotóxica sinérgica o antagónica ($p < 0.001$) con citotoxicidad nula o moderada y después de cierta concentración presentaron citotoxicidad alta. En la tabla 3 y figura 3, se observa interacción **sinérgica** sin actividad metabólica entre B[a]P y Trp-P-1 independiente de quién sea el compuesto variable. Cuando el B[a]P está fijo el sinérgismo se presenta en las concentraciones de 20 y 40 μM , con interacción citotóxica superior al 50% a partir de 50 μM , pero cuando el B[a]P es variable el sinérgismo se da a partir de 20 μM y no se presenta efecto citotóxico. En estas mezclas el aumento en la longitud de cola es de 1.6 veces y se duplica la frecuencia de células con daño. Con actividad metabólica esta misma mezcla presenta sinérgismo hasta 40 μM , en esta mezcla se duplica la longitud de cola, pero el aumento de células con daño no cambia y es altamente citotóxica después de 50 μM . También se observó sinérgismo entre DMBA y Trp-P-1 variable hasta 50 μM solamente con actividad metabólica, se duplicó la longitud de cola en la mezcla, el porcentaje de células con daño fue 10 veces mayor y solo se presentó citotoxicidad alta en la concentración de 100 μM . En general todas estas interacciones presentan tipo de daño medio.



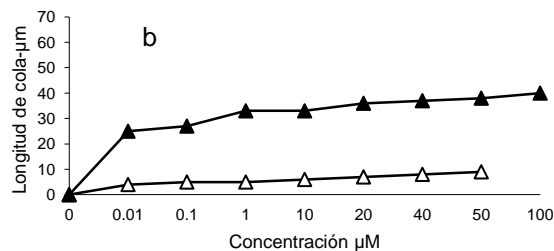
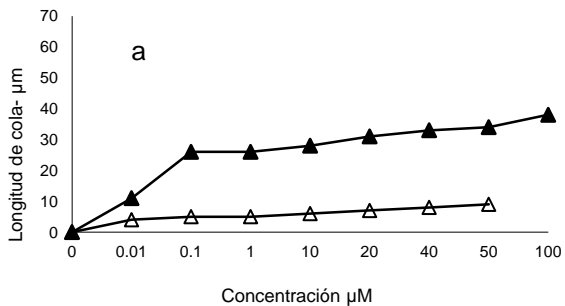


Figura 3. Genotoxicidad por interacción sinérgica durante 1 hora de exposición en linfocitos humanos. a) Interacción entre B[a]P (○) y Trp-P-1 (△): B[a]P(1µM)+Trp-P-1 (▲) y Trp-P-1 (1µM)+B[a]P (●), sin actividad metabólica (arriba) y con actividad metabólica (abajo). b) Interacción entre DMBA y Trp-P-1 (△): DMBA (1µM)+Trp-P-1 (▲) con actividad metabólica. La magnitud del daño se basó en la longitud de migración (µm) del ADN. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO, 1%) como control negativo, produjo una longitud de cola de 15 µm. A cada valor se le restó el control.

Sin S9 solo se observó interacción **antagónica** entre Trp-P-1+DMBA variable desde 40 µM. El DMBA individual presenta citotoxicidad moderada en todas las concentraciones estudiadas (tabla 1) en cambio, en esta mezcla binaria, la citotoxicidad es casi nula, pudiéndose considerar esta mezcla anticitotóxica. La genotoxicidad en la mezcla disminuye aproximadamente 1 vez y el tipo de daño observado es bajo, además, la frecuencia de células con daño disminuye a un 50%. En presencia de S9, hubo interacción antagónica entre Trp-P-1+MX variable para todas las concentraciones utilizadas de la furanona, la disminución en la genotoxicidad de la mezcla fue superior a 1.5 veces, el tipo de daño observado fue bajo, la frecuencia de células con daño disminuye casi a un 100% en la concentración menor y la citotoxicidad fue inferior al 20%. Otra mezcla con efecto antagónico a estas mismas condiciones fue MX+DMBA variable desde 0.01

hasta 20 μM , la disminución en la genotoxicidad fue de 1.5 veces, pero fue citotóxica desde 40 μM del hidrocarburo. El tipo de daño presentado fue nulo y bajo y hubo una disminución del 50% en la frecuencia de células con daño (tabla 3 y figura 4).

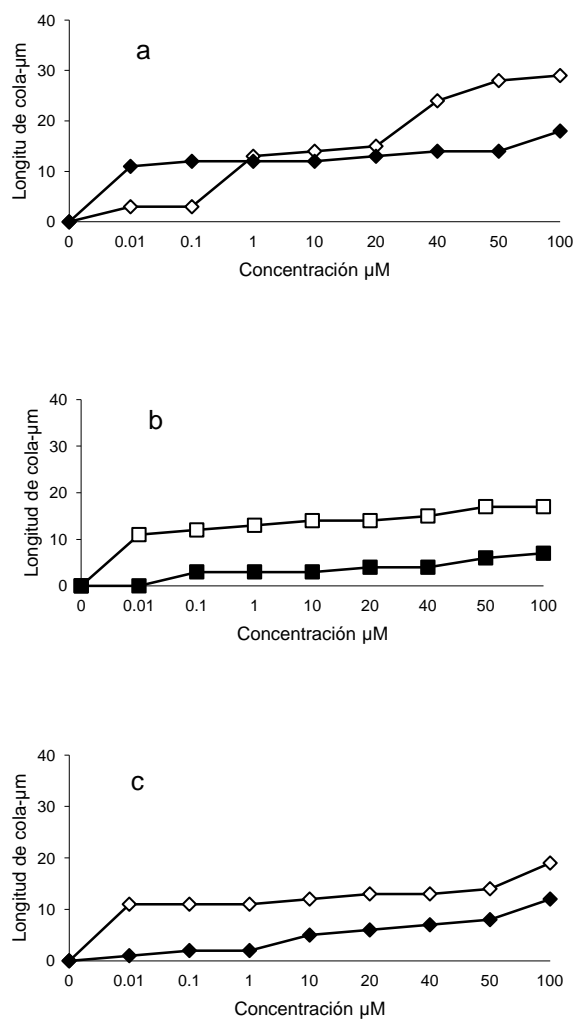


Figura 4. Genotoxicidad por interacción antagonista durante 1 hora de exposición en linfocitos humanos. a) DMBA (◇), Trp-P-1: Trp-P-1(1 μM)+DMBA (◆), sin actividad metabólica. b) Trp-P-1 y MX (□): Trp-P-1(1 μM)+MX (■), con actividad metabólica. c) DMBA (◇), MX: MX+DMBA (◆) con actividad metabólica. La magnitud del daño se basó en la longitud de migración (μm) del ADN. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO, 1%) como control negativo, produjo una longitud de cola de 15 μm . A cada valor se le restó el control.

Tabla 3. Genotoxicidad de mezclas binarias en linfocitos humanos tratados con B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica (S9), durante 1 h de exposición.

Tiempo	Compuesto fijo (1µM) (X ±DS), (TD), (%CD), (%V)	Compuesto variable	Concentración (µM)	Genotoxicidad compuesto				Genotoxicidad mezcla				Interacción
				(X±DS) µm	TD	%CD	%V	(X±DS)	TD	%CD	%V	
Control	DMSO	—	1%	15±3	0	15	100	—	—	—	—	—
1h sin S9	B[a]P (19±3), (1), (33), (96)	Trp P1	0.01	17±7	0	30	100	20±3	1	16	87	ND
			0.1	17±5	0	30	100	21±2	1	19	87	
			1	19±1	1	40	100	22±1	1	18	86	
			10	21±1	1	43	95	27±1	1	28	86	
			20	21±1	1	50	88	53±7	2	90	86	Sinergismo*
			40	21±1	1	60	55	65±5	3	95	85	
			50	27±7	1	59	50	74±10	3	100	48	Citotóxico
	100	36±8	1	80	0	75±9	3	100	0			
	Trp P1 (19±1), (1), (40), (100)	B[a]P	0.01	16 ±4	0	10	100	18±7	0	10	95	ND
			0.1	19 ±7	1	20	89	18±3	0	9	96	
1			19 ±3	1	33	96	22±1	1	11	96		

			10	20 ±1	1	36	82	20±5	1	15	95	<i>Sinergismo*</i>
			20	21±1	1	41	83	35±4	1	58	93	
			40	22±1	1	45	91	42±6	2	89	94	
			50	26±1	1	58	84	61±9	3	100	66	
			100	27±4	1	46	84	71±9	3	100	50	
	Trp P1 (19±1), (1), (40), (100)	DMBA	0.01	18±6	0	21	86	26±6	1	48	100	ND
			0.1	18±7	0	23	75	27±9	1	64	97	
			1	28±6	1	43	75	28±2	1	65	96	
			10	29±5	1	48	72	27±7	1	66	95	
			20	30±8	1	61	69	28±7	1	60	80	<i>Antagonismo-*</i> <i>anticitotóxico</i>
40			39±9	2	90	65	29±7	1	68	73		
50			43±9	2	86	60	29±6	1	71	85		
100	44±9	2	98	59	33±9	1	81	83				
1 h Con S9	B[a]P (28±4), (1), (69), (94)	Trp P1	0.01	19±3	1	11	100	26±5	1	75	84	ND
			0.1	20±5	1	23	100	41±6	2	99	80	<i>Sinergismo*</i>
			1	20±1	1	23	100	41±7	2	100	76	
			10	21±2	1	28	97	43±9	2	99	75	
			20	22±5	1	28	85	46±9	2	100	74	
			40	23±4	1	41	65	48±9	2	100	60	

			50	24±5	1	49	58	49±9	2	100	7	Citotóxico
			100	37±6	1	96	0	53±9	2	100	0	
1 h Con S9	DMBA (26±5), (1), (55), (100)	Trp P1	0.01	19±3	1	11	100	40±9	2	99	96	Sinergismo*
			0.1	20±5	1	23	100	42±8	2	99	94	
			1	20±1	1	23	100	48±9	2	100	85	
			10	21±2	1	28	97	48±9	2	98	84	
			20	22±5	1	28	85	51±8	2	100	82	
			40	23±4	1	41	65	52±9	2	100	78	
			50	24±5	1	49	58	53±10	2	100	77	
	100	37±6	1	96	0	55±9	2	99	11	citotóxica		
	Trp P1 (28±6), (1), (43), (75)	MX	0.01	26±3	1	70	100	15±3	0	1	98	Antagonismo*
			0.1	27±5	1	78	95	18±5	0	9	93	
			1	28±2	1	78	82	18±3	0	11	91	
			10	29±3	1	85	81	18±4	0	23	90	

			20	29±2	1	86	80	19±4	1	19	88	
			40	30±5	1	87	79	19±4	1	19	86	
			50	32±6	1	95	79	21±5	1	35	81	
			100	32±5	1	95	78	22±8	1	40	79	
	MX (28±2), (1), (78), (82)	DMBA	0.01	26±4	1	54	100	16±4	0	6	78	<i>Antagonismo*</i>
0.1			26±3	1	55	100	17±3	0	5	53		
1			26±5	1	55	100	18±4	0	10	53		
10			27±6	1	73	91	20±7	1	31	53		
20			28±5	1	61	78	21±5	1	30	52		
40			28±3	1	61	77	22±7	1	39	33	Citotóxica	
50			29±9	1	66	76	23±7	1	51	32		
100	34±8	1	88	75	27±6	1	80	26				

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado.

X±DS: Longitud de cola ± desviación estándar.
 TD: Tipo de daño
 % CD: Porcentaje de células con daño
 % V: Porcentaje de viabilidad.
 *: p<0.001
 ND: Efecto no detectable

Efecto de dosis de las interacciones

En la tabla 4 se observa el efecto de dosis obtenido mediante un análisis de regresión simple de las mezclas binarias que presentaron interacción genotóxica. En general se observó un incremento en la longitud de cola relacionado con la dosis (tabla 3), con un coeficiente de correlación superior al 90% (tabla 4).

Tabla 4. Efecto de dosis de las mezclas binarias que presentaron interacción genotóxica.

Mezcla	1 h	
	Sin S9	Con S9
B[a]P-Trp-P-1	$Y = \sqrt{(a+b*X)} *$ $R^2=97.6$	
Trp-P-1- B[a]P	$Y = \sqrt{(a+b*X)} *$ $R^2=98.6$	
B[a]P-Trp-P-1		$Y = 1/(a+b/X) *$ $R^2=92.3$
DMBA-Trp-P-1		$Y = a*X^b *$ $R^2=97.5$
Trp-P-1-MX		$Y = \sqrt{(a+b*\sqrt{X})} *$ $R^2=91.6$
MX-DMBA		$Y = (a+b*\sqrt{X})^2 *$ $R^2=98.3$

Los resultados son obtenidos de un análisis de regresión simple.

* $p < 0.001$ significancia de la ecuación que explica que el modelo utilizado para el análisis de regresión simple es adecuado para el tipo de datos obtenidos.

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto genotóxico en el ADN de linfocitos humanos producido por la interacción de mezclas binarias de cuatro mutágenos, con el fin de tener una aproximación en comprender como es el comportamiento de las mezclas para aportar así al posible análisis de riesgo de las mezclas complejas. Un estudio de análisis de riesgo comprende, entre otras: la identificación del peligro, el análisis de dosis respuesta (determinación de umbral) y de exposición y la caracterización del riesgo (34). En esta investigación se encontró diferente respuesta entre las mezclas binarias de B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX en linfocitos humanos como no efecto, citotoxicidad, sinergismo o antagonismo como se analiza a continuación.

Mezclas binarias

A pesar de que los compuestos utilizados son mutágenos y presentaron actividad genotóxica individualmente (Tabla 1), algunas de las mezclas binarias durante la exposición corta de 1 h no presentaron ningún efecto con y sin actividad metabólica. Las mezclas de la furanona MX con cualquiera de los otros tres mutágenos son un ejemplo de ello, el MX es un mutágeno de acción directa en comparación con los otros tres B[a]P, DMBA y Trp-P-1 que requieren activación metabólica. Hay reportes que indican que el MX *in vitro* es inactivado por enzimas metabólicas (35), en estas mezclas la no evidencia de daño puede ser debido por una competencia por los citocromos contenidos en la mezcla S9 para la inactivación del MX y la activación de los otros tres mutágenos. Los sistemas de reparación del ADN requieren más de 1 h para iniciar y/o detectar el daño, sin embargo, es posible que la expresión basal de las enzimas de reparación sea suficiente para reparar las lesiones ocasionadas por el MX sin S9²⁶ puesto que los otros tres mutágenos

requieren activación metabólica y los linfocitos no expresan los citocromos suficientes para su inducción (26, 36).

Citotoxicidad

Las mezclas binarias en las cuales la amina Trp-P-1 fue variable la citotoxicidad presentada se le atribuye a la amina, ya que ella de manera individual es tóxica a partir de la dosis de 40 μ M (tablas 1 y 2), en comparación con los otros dos mutágenos DMBA y MX.

Aunque los dos hidrocarburos B[a]P y DMBA no son citotóxicos individualmente en las concentraciones evaluadas, las mezclas entre ellos presentaron la mayor toxicidad. Esto puede ser debido a que muchos hidrocarburos se unen al receptor aril hidrocarburo e inducen otros blancos del receptor aril hidrocarburo, aparte de los promotores del p450 (37, 38), por ejemplo activar vías alternativas de toxicidad (39) o porque los HPA aumentan la actividad metabólica de ellos mismos y de otros generando metabolitos activos altamente tóxicos (40).

Genotoxicidad

Los linfocitos pueden expresar los citocromos que metabolizan el B[a]P y la amina Trp-P-1, sin actividad metabólica se observó una **potenciación** de ambos, independientemente de quién es el compuesto variable (Tabla 4), esto puede ser debido a que el B[a]P induce la síntesis de CYP 1A1 y 1A2, este último actúa sobre aminas heterocíclicas (HA) y a su vez éstas inducen la producción de 1A2 (41), serían dos maneras de aumentar el metabolito activo de cada compuesto, sería un proceso de retroalimentación positiva en la inducción de los citocromos. De otro lado, la amina (Trp-P-1) puede aumentar la expresión del receptor aryl hidrocarburo, el cual se une a los PAH (B[a]P), translocándose al núcleo y convirtiéndose en un factor de transcripción para la producción de CYP1A1, que es quien lo metaboliza, aumentando de esta manera los metabolitos activos (42). La citotoxicidad presentada cuando el Trp-P-1 es variable sin S9 se debe a la citotoxicidad de este

compuesto puro. Con actividad metabólica puede ocurrir que cuando el Trp-P-1 está variable se acetile por acción de enzimas de la fase II que también son inducidas y se generen metabolitos más electrofílicos muy genotóxicos (41).

La mezcla DMBA-Trp-P1 variable con S9, mostró **sinergismo** desde la primera dosis (tabla 3). La potenciación del DMBA sobre la amina puede ser ocasionada por la inducción de enzimas de fase II específicamente acetil transferasas cuyo sustrato son las aminas hidroxiladas por los citocromos provenientes del S9, generando metabolitos altamente genotóxicos (41). Sin embargo, se requiere profundizar en la identificación química de estos productos o posiblemente en la generación de nuevos compuesto.

Independiente de la actividad metabólica en las mezclas con efecto genotóxico sinérgico se observa que hay una gran cantidad de células dañadas (superior al 60%), con una viabilidad superior al 75% y con tipo de daño medio (2) (tabla 3). Estos resultados implican que la exposición a estas mezclas y durante este tiempo constituye un mayor riesgo genotóxico. Sin embargo, como se observa en las figuras 3 y 5 en algunas el LOAEL presentado en las mezclas es más bajo que el compuesto puro, pero presentan umbral genotóxico, es decir, se puede encontrar la máxima dosis en la cual no se observa efecto adverso (NOAEL). El hallazgo de esta dosis es el inicio para detectar dosis permisibles de exposición en las mezclas que contengan estos mutágenos a estas concentraciones (26, 36, 39, 43).

El antagonismo que se presentó se debe a que hay modulación en la inducción enzimática que lleve a que uno de los mutágenos individuales pueda ser un potente agonista de los receptores o la mezcla afecta la capacidad de inducción de los citocromos evitando así la activación de los mutágenos indirectos (44). Además, los componentes de una mezcla pueden interactuar en un gran número de vías sobre un mismo sitio común semejante a un receptor o a una enzima. O ambos se pueden unir sin activar la enzima o unirse a ella con una disociación constante y lenta. La inhibición de enzimas del citocromo por HPA individuales puede influir la activación de otros procarcinógenos (37).

Uno de los pasos en el análisis de riesgo son las evaluaciones de dosis-respuesta del mutágeno con el fin de determinar o no umbrales genotóxicos, en este trabajo se hace una aproximación de este tipo de análisis. En la tabla 4 y figuras 3 y 5 se presenta la relación dosis-respuesta de las interacciones genotóxicas sinérgicas que indujeron las mezclas binarias. En algunas mezclas se puede observar efecto dosis-respuesta desde la concentración más baja empleada, mientras que otras presentan este efecto a partir de concentraciones más altas, afirmando los modelos dosis-respuesta genotóxicos en los cuales se presenta un umbral para el efecto (43). En esta investigación se hace un aporte importante en el abordaje para entender los procesos que pueden ocurrir cuando en una mezcla hay presente mínimo dos mutágenos. El diseño establecido permitió evaluar mezclas binarias a bajas dosis y poder atribuir a cuál de los compuestos se debe el efecto, ya que en las mezclas los mutágenos pueden actuar combinadamente alterando la expresión de genes, alterando el metabolismo o producción de reguladores celulares o cambiando los niveles de concentración intracelular de iones. En realidad muy pocos mutágenos tienen un blanco celular único, muchos actúan en múltiples órganos o tener diversos blancos dentro de la misma célula, o es posible que una célula no sea el blanco para ese compuesto (37). Lo importante de este diseño es que puede ser aplicado para tener un acercamiento de lo que puede estar ocurriendo en una mezcla, para estimar el riesgo se deben entender los mecanismos celulares y moleculares que determinan el fenómeno toxicológico o genotóxico expresado en y cuantificar la dosis que se absorbe del compuesto químico y la magnitud de la respuesta. Determinar la concentración del mutágeno en la mezcla representa un punto crítico para el análisis, en este estudio se demuestra que la concentración de cada mutágeno en la mezcla es determinante para la producción del efecto.

Los resultados de esta investigación sugieren que no necesariamente la presencia de dos mutágenos en una mezcla implica un riesgo, sino que es necesario determinar si esto ocurre con todos los componentes de una mezcla a qué concentración y qué procesos o mecanismos están determinando este tipo de interacciones.

CONCLUSIÓN

Debido a la dificultad de determinar como un contaminante interactúa con el resto de componentes de una mezcla y que este campo es poco explorado pero crece en importancia, este trabajo hace un aporte al análisis de riesgo de las mezclas validando un modelo de análisis que permite dilucidar cuál compuesto tiene el efecto sobre otro y también se demostró que según el tipo de compuestos en la mezcla se tendrá o no un umbral de riesgo.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses de este trabajo con los autores o con las Instituciones involucradas en el desarrollo del mismo. No existe ningún interés de sacar provecho económico o un afán de notoriedad, prestigio personal o el reconocimiento y promoción profesional.

Fuente de financiación

COLCIENCIAS, Universidad Pontificia Bolivariana y Universidad de Antioquia.

Referencias

1. National Research Council. Committee on Methods for the *in vivo* toxicity testing of complex mixtures. Board on environmental studies and toxicology commission on life sciences. Complex mixtures: method for *in vivo* toxicity testing. Washington: National Academy Press; 1988.
2. Carpenter D, Arcaro K, Spink D. Understanding the human health effects of chemical mixtures. Environ Health Perspect. 2002;110:25-37.
3. Poirier MC, Beland FA. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. Chem Res Toxicol. 1992;5:749-55.
4. Kakizoe T. Chemoprevention of cancer – focusing on clinical trials. Jpn J Clin Oncol. 2003;33(9):421-442.

5. Williams GM, Weisburger JH. Interactions of chemical carcinogens: environmental mutagens and carcinogens. New York : A.R. Liss Publ; 1988. p. 288-94.
6. Deng ChZ, Fons MP, Rosenblatt J, El-Zein RA, Abdel-Rahman SZ, Albrecht T. Nickel potentiates the genotoxic effect of benzo(a)pyrene in Chinese Hamster lung V79 cells. *Environ Mol Mutagen.* 2006;47:150-161.
7. Majer BJ, Hofer E, Cavin C, Lhoste E, Uhl M, Glatt HR, et al. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (Hep G2). *Food Chem Toxicol.* 2005;43(3):433-441.
8. Ogawa S, Hirayama T, Nohara M, Tokuda M, Hirai K, Fukui S. The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene in *Salmonella typhimurium* strains. *Mutat Res.* 1985;142:103-107.
9. Wakabayashi K, Totsuka Y, Fukutome K, Oguri A, Ushiyama H, Sugimura T. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolines. *Mutat Res.* 1997;376:253-259.
10. Hasegawa R, Shirai T, Hakoi K, Takaba K, Iwasahi S, Yoshida T, et al. Synergistic enhancement of glutathione S-transferase placental form-positive hepatic foci development in diethylnitrosamine treated rats by combined administration of five heterocyclic amines at low doses. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82:1378-1384.
11. Feng ZC, Hu W, Rom WN, Costa M, Tang M. Chromium exposure enhances polycyclic aromatic hydrocarbon ADN binding at the P₅₃ gene in human lung cells. *Carcinogenesis.* 2003;24(4):771-778.
12. Flessel P, Liu KS, Paz MK, Waldman J, Girman J. Unintentional carbon monoxide deaths in California from residential and other nonvehicular sources. *Environ Health.* 1988;55(6):375-381.
13. Haugen DA, Meyrick JP. Mixtures of polycyclic aromatic compounds inhibit mutagenesis in the *Salmonella*/microsome assay by inhibition of metabolic activation. *Mutat Res.* 1983;116:257-269.

14. Hermann M. Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixture. *Mutat Res.* 1981;90:399-409.
15. Fernández-Sánchez JF, Segura Carretero A, Cruces-Blanco C, Fernández-Gutiérrez A. Highly sensitive and selective fluorescent optosensor to detect and quantify benzo(a)pyrene in water samples. *Anal Chim Acta.* 2004;506(1):1-7.
16. Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect.* 2002;110: 451-88.
17. Polynuclear aromatic compounds: chemical, environmental experimental data. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man. 1983;32:1-453.
18. Sugimura T, Nagao M, Kawachi T, Honda M, Yahagi T, Seino Y, et al. Mutagen-carcinogens in foods, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, editors. *Origins of human cancer.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p.1561-1577.
19. Orozco LY, López C, Naranjo LC, Zuleta M. DNA damage and identification of mutagenic heterocyclic amines in municipal wastewater which contaminate water purification plants. *Environ Mol Mutagen.* 2003;41(34):196.
20. Onstad GD, Weinberg H. Evaluation of the stability and analysis of halogenated furanones in disinfected drinking waters. *Anal Chim Acta.* 2005;534:281-292.
21. Hamilton JW. Chemical mutagenesis and carcinogenesis. In: Bertino J, editor. *Encyclopedia of cancer.* 2. ed. New York: Academic Press; 2002. p. 433-447.
22. ICH Expert Working Group. S2A: guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals. In: *Proceedings: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH 1995.* Canadá: Minister of Public Works and Government Services; 1996.
23. National Research Council. *Environmental tobacco smoke: measuring exposures and assessing health effects.* Washington: National Academy Press; 1986.

24. Kohji Y, Kusakabe H, Tanaka N. Comparative studies of MCL-5 cells and human lymphocytes for detecting indirect-acting clastogens. *Mutat Res.* 1998;412:55-61.
25. Jansson K, Mäki-Paakkanen J, Vaittinen SL, Vartiainen T, Komulainen H, Tuomisto J. Cytogenetic effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in rat peripheral lymphocytes in vitro and in vivo. *Mutat Res.* 1993;229:25-28.
26. Platel A, Gervais V, Sajot N, Nesslany F, Marzin D, Claude N. Study of gene expression profiles in TK6 human cells exposed to DNA-oxidizing agents. *Mutat Res.* 2010; Jul 7;689(1-2):21-49.
27. Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutat Res.* 2003;534:85–92.
28. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-191.
29. Brink A, Schulz B, Kobras K, Lutz WK, Stoppe H. Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mutat Res.* 2006;Feb 28;603(2):121-8.
30. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi A, et al. Single cell gel/ Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35:206-221.
31. Trisnawaty A, Vian L, Sabatier R, Cano JP. *In vitro* detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. *Mutat Res.* 2000:227-234.
32. Uhl M, Helma C, Knasmüller S. single cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res.* 1999 May; 17:441(2):215-224.
33. Uhl M, Christoph H, Siegfried K. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res.* 1999; 441:215-224.
34. Environmental Protection Agency. Guidelines for mutagenicity risk assessment. Washington, DC: Risk Assessment Forum;1986.

35. Kinae N, Sugiyama C, Nasuda MY, Goto K, Tokumoto K, Furugori M, et al. Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water. *Water Sci Technol*. 1992;25:333-340.
36. Jenkins GJ, Zair Z, Johnson GE, Doak SH. Genotoxic thresholds, DNA repair, and susceptibility in human populations. *Toxicology*. 2010 Dec 30;278(3):305-10.
37. Cherng SH, Lin P, Yang JL, Hsu SL, Lee H. Benzo[g,h,i]perylene synergistically transactivates benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;170: 63–68.
38. Hestermann E, Stegeman J, Hahn M. Relationships among the cell cycle, cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression in PLHC-1 cells. *Aquat Toxicol*. 2002;58(3-4):201-213.
39. Pottenger L, Gollapudi B. A case for a new paradigm in genetic toxicology testing. *Mutat Res*. 2009;148-151.
40. Spink D, Spink B, Cao J, DePasquale J, Pentecost B, Fasco M, et al. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis*. 1998;19:291-298.
41. Ioannides C, Parke DV. The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab Rev*. 1990;22:1-86.
42. Hahn M. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*. 2002;141(1-2):131-160.
43. Kirsch-Volders M, Gonzalez L, Carmichael P, Kirkland D. Risk assessment of genotoxic mutagens with thresholds: a brief introduction. *Mutat Res*. 2009;678:72-75.
44. Spink DC, Wu SJ, Spink BC, Hussain MM, Vakharia DD, Pentecost BT, et al. Kaminsky. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;226(3): 213–224.

Producto 5. Artículo

Detección de daño en el ADN de linfocitos humanos expuestos por 24 horas a mezclas binarias de mutágenos.

Detection of DNA damage in human lymphocytes exposed to binary mixtures of mutagens by 24 hours.

Isabel Cristina Ortiz Trujillo, MSc. Profesora Titular Universidad Pontificia Bolivariana, Coordinadora del grupo de Biología de Sistemas; Carlos Alberto Peláez Jaramillo, PhD. Profesor titular Universidad de Antioquia, Coordinador del grupo interdisciplinario de Estudios Moleculares, GIEM; Luz Yaneth Orozco J, MSc. Grupo de Gestión y Modelación Ambiental GAIA Universidad de Antioquia y Margarita Zuleta Bustamante†. MSc. Profesora Universidad de Antioquia.

Instituciones a las que se le debe atribuir el trabajo: Universidad Pontificia Bolivariana, Universidad de Antioquia.

Responsable de la correspondencia: Isabel Cristina Ortiz Trujillo. Calle 78B 72A-109, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Campus Robledo.

Apoyo recibido por COLCIENCIAS, Universidad Pontificia Bolivariana y Universidad de Antioquia.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar *in vitro* el efecto sobre el ADN de linfocitos humanos después de 24 horas de exposición producido por la interacción de los mutágenos puros benzo(a)pireno, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol y 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona, identificados en diferentes tipos de mezclas complejas.

Metodología: Linfocitos humanos fueron expuestos con los mutágenos individuales puros benzo(a)pireno (B[a]P), 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA), acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol (Trp-P-1) y 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona (MX) y sus mezclas binarias durante 24 h con y sin activación metabólica, posteriormente se evaluó la viabilidad con el colorante de exclusión azul tripano y el efecto genotóxico a través del ensayo cometa alcalino. Como parámetro de daño se tuvo en cuenta la longitud de migración del ADN (μm), el porcentaje de células con daño y se clasificó el daño encontrado en 5 categorías arbitrarias según la migración del DNA.

Resultados: En este trabajo se presentaron efectos citotóxicos, antagónicos y sinérgicos y hubo mezclas que no presentaron ningún tipo de efecto. El principal efecto observado fue citotóxico sobre todo con la interacción entre los dos hidrocarburos con y sin actividad metabólica. En general todas las interacciones presentaron tipo de daño medio con gran cantidad de células dañadas. Finalmente, se pudo determinar el Nivel a partir del cual se observan efectos adversos para todas las mezclas y el Nivel hasta donde no se observan efectos adversos solo para algunas.

Conclusión: Debido a la dificultad de determinar como un contaminante interactúa con el resto de componentes de una mezcla y que este campo es poco explorado pero crece en importancia, este trabajo hace un aporte al análisis de riesgo de las mezclas validando un modelo de análisis que permite dilucidar cuál compuesto tiene el efecto sobre otro y también se demostró que según el tipo de compuestos en la mezcla se tendrá o no un umbral de riesgo.

Palabras clave: Sinergismo, Antagonismo, Genotoxicidad, Ensayo Cometa alcalino, Interacciones Binarias NOAEL y LOAEL.

SUMMARY

Introduction. Many mutagens are present contained in complex mixtures; they may exert synergistic, additive or antagonistic interactions. Few studies investigate the interactions between chemicals and the development of experimental approaches to elucidate what is the agent responsible for the effect in the mix is a key point to address the problem of complex mixtures.

Objective. To evaluate in vitro the effect on human lymphocyte DNA caused by the interaction of pure mutagens benzo(a)pyrene, 7,12-dimetilbenzo(a)anthracene, 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol acetate, and 3-chloro-4-(diclorometil)-5-hidroxy-2(5H)-furanone.

Methodology. Human lymphocytes were exposed to binary mixtures of mutagens for 24 hour with and without metabolic activation. Viability was assessed with trypan blue dye and the genotoxicity by Comet assay.

Results. Some mixtures showed no cytotoxic or genotoxic effect, others showed significant synergistic and antagonistic effects, dose effect and threshold effect. In general, the interactions showed genotoxic damage medium type and a great number of damaged cells. For all the mixtures, the minimum concentration at which adverse effects are observed could be estimated, while only for some of them, it was possible to calculate the maximum concentration at which no observed adverse effect level.

Conclusion. This research makes an important contribution to understand the processes that can occur when at least two mutagens are present in a mixture and validates an analytical model that determines which component has an effect on another. The results also showed that depending on the type of compounds in the mixture, there will be or not a risk threshold.

Key Words: Synergism, Antagonism, Genotoxicity, alkaline comet assay, binary interactions, NOAEL, LOAEL.

INTRODUCCIÓN

En el ambiente se presentan frecuentemente mutágenos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (1), aminas heterocíclicas (2) y particularmente en el agua de consumo se pueden encontrar los anteriores más subproductos de cloración (3, 4) todos ellos asociados con procesos de carcinogénesis (5).

La mayoría de las personas estamos expuestas a mezclas químicas de compuestos orgánicos e inorgánicos a bajas concentraciones. Los mutágenos contenidos en las mezclas llegan continuamente a la población y aunque estén en cantidades muy pequeñas, del orden de partes por billón (ppb) o partes por trillón (ppt) (dosis aparentemente permisibles) que no conlleva a muerte celular, genera la acumulación de mutaciones (6); que de recaer en células somáticas, en genes involucrados en la regulación de la división celular (proto-oncogenes), en genes que participan en la reparación de daños en el ADN, en genes que participan en uniones celulares o en

genes supresores de tumores, pueden iniciar el proceso de carcinogénesis (7). Aunque la metodología corriente para evaluar el riesgo para la salud humana asume interacciones aditivas entre los contaminantes de una mezcla simple (binaria o terciaria) y compleja, a pesar de que realmente en estas mezclas pueden ocurrir muchas interacciones químicas, las cuales producen efectos sinérgicos o antagónicos. La toxicidad y carcinogenicidad de las mezclas está influenciada por un complejo grupo de interacciones que involucra no solo las propiedades químicas de cada compuesto sino la capacidad de inducción de enzimas metabólicas como los citocromos P450 y de receptores que permiten la inducción de éstos, de esta manera un compuesto no carcinógeno puede aumentar o disminuir la actividad metabólica de un compuesto procarcinógeno a su forma mutagénica. Muchas investigaciones se han desarrollado tendientes a demostrar estos efectos, Ogawa (8) determinó que combinaciones binarias de quercetín y aminos aromáticas presentaron efectos superiores a la suma de los componentes de la mezcla (sinergismo) y Wakabayashi (9) encontraron que algunas aminos heterocíclicas aromáticas (HAA) (anilina y o-toluidina) pueden transformar compuestos no mutagénicos en mutagénicos en *Salmonella* en presencia de la mezcla S9. Contrariamente, Salamote (10) encontraron que la mutagenicidad de una mezcla que contenía Benzo(a)pireno (B[a]P) y benzo(rst)pentafeno (B(rst)P) fue inferior a la suma de los componentes de la mezcla (antagonismo). Hermann (11) concluyó que varios hidrocarburos no mutagénicos aumentaron la mutagenicidad de B[a]P y que muchos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) mutagénicos produjeron una disminución y algunas veces eliminaron la mutagenicidad de este hidrocarburo. Si ellos no son reparados, pueden causar una mala codificación, con la producción de mutaciones permanentes. Si estas mutaciones se presentan en regiones críticas de oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes involucrados en la regulación del ciclo, del crecimiento, entre otros, el resultado puede ser el desarrollo de un cáncer (12).

Actualmente se acepta que la gran mayoría de los carcinógenos genotóxicos pueden detectarse utilizando una batería de ensayos para genotoxicidad que evalúan diferentes puntos de respuesta biológica (mutación génica, alteración cromosómica o genómica) como inducción de micronúcleos, aberraciones cromosómicas, electroforesis en gel de célula individual (Cometa), inducción de mutaciones en *Salmonella* (Test de Ames), entre otros (13). De manera general, los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad se usan principalmente para la predicción de la carcinogenicidad, dado que se ha demostrado en humanos una relación entre la exposición a diversos compuestos químicos y el proceso de carcinogénesis (14). En la última década el ensayo de electroforesis en gel de migración de célula única o Ensayo COMETA se ha convertido en uno de los métodos estándar para la evaluación de daño en el ADN, con aplicaciones en evaluación de genotoxicidad, biomonitoreo, ecotoxicología, epidemiología molecular e investigación básica en daño y reparación del ADN. Es un método simple, sensible, versátil, rápido y económico, requiere bajas cantidades de muestra y cuantifica la cantidad de daño generado por rompimiento del ADN genómico; además, el

número de publicaciones que incluyen este ensayo aumentan exponencialmente cada año. Después del quinto taller de trabajo sobre pruebas de genotoxicidad (15), el ensayo Cometa ha ganado máxima aceptabilidad entre la comunidad científica y recomiendan usarlo rutinariamente en estudios de evaluación de seguridad genotóxica de productos para que sean avalados con el nivel de regulación internacional.

El concepto de umbral en la genética toxicológica es usado para análisis de riesgo en compuestos puros, pero sigue siendo materia de debate. En el análisis de riesgo no se hace mucho énfasis en el nivel de efectos adversos genotóxicos no observados (NOAEL) y por supuesto, mucho menos se consideran para las mezclas complejas. Existen muy pocos estudios que investiguen las interacciones entre dos o más compuestos químicos y el análisis de riesgo que comprende la identificación del peligro, el análisis dosis-respuesta, análisis de exposición y caracterización del riesgo solo se lleva a cabo para compuestos puros. Un punto clave para abordar el problema de mezclas complejas es la planeación de enfoques experimentales, para seleccionar estrategias que puedan relacionar preguntas como exposición, genotoxicidad, citotoxicidad, blanco a evaluar y valor predictivo de los resultados. Una de las preguntas en mezclas es establecer el agente primario responsable del efecto y para esto es necesario conocer y cuantificar que hay en la mezcla para poder evaluarla (16), esta investigación apunta en esta dirección. El presente trabajo propone un diseño experimental que permita un acercamiento a la comprensión de los procesos que se dan entre los compuestos presentes en las mezclas complejas, de tal manera que se tenga una idea de cómo abordar el problema del análisis de riesgo para las mezclas complejas, dilucidando en cuáles de ellas se presenta o no efecto umbral y en cuáles se puede determinar los valores de NOAEL y Nivel a partir del cual se observan efectos adversos (LOAEL). Esta investigación describe la actividad genotóxica evaluada por medio del ensayo Cometa en linfocitos humanos tratados por 24 horas con cuatro carcinógenos puros bien conocidos, comúnmente identificados en matrices complejas ambientales como agua, aire y alimentos, B[A]P, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA), acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5h-pirido[4,3-b]indol, (Trp-P-1) y 3-cloro-4(diclorometil)5-hidroxi-2(5H) furanona (MX), de manera individual y a partir de sus mezclas binarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias químicas

Los mutágenos B[a]P (CAS 50-32-8), DMBA (CAS 57-97-6), MX, Trp-P1 (CAS 62450-06-0), los medios DMEM-F12 y RPMI 1640, el DMSO (CAS 67-68-5), el suero bovino fetal, la tripsina, la penicilina (CAS 69-57-8), la estreptomycin CAS 21736-83-4), el Hystopaque, los colorantes bromuro de etidio (CAS 1239-45-8) y azul de tripano (CAS 72-57-1), la agarosa de bajo punto de fusión (LM, CAS 9012-36-6), la agarosa de punto de fusión normal (NM, CAS 9012-36-6), el cloruro

de sodio (NaCl, CAS 7646-14-5), el hidróxido de sodio (NaOH, CAS 1310-73-2), el detergente N Lauril sarcosinato de sodio (CAS 137-16-6), el ácido etilendiamíntetracético (EDTA, CAS 60-00-4) fueron obtenidos en Sigma Aldrich, la mezcla S9 se preparó antes de cada prueba, usando la fracción S9 de hígado de rata inducida con Aroclor 1254 (código 11-01 L.2, liofilizado, NADP reagensys “A” y “B” códigos 60.2004 y 60-201.4L) obtenido de MOLTOX-Molecular Toxicology Inc y todos los otros reactivos utilizados fueron adquiridos de Merck. Los mutágenos se disolvieron en DMSO, la concentración final de DMSO en los cultivos celulares no excedió el 1%.

Cultivo de los linfocitos

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de un voluntario joven (25 años), saludable, no fumador, sin ningún tipo de tratamiento clínico, no deportista de alto rendimiento. A partir de 5.0 mL de sangre total heparinizada, obtenida en las horas de la mañana, se tomó 1.0 mL de sangre, 0.2 mL de fitohemaglutinina (PHA) y se adicionaron a 8 mL de medio RPMI-1640, suplementado con 5% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (56°C, 30 minutos), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y se cultivaron por 48 horas a 37°C. Luego, la sangre se centrifugó y el precipitado de células se depositó en un gradiente de densidad de Hystopaque. Posterior a la centrifugación (2.000 rpm, 25°C, 30 min), se colectaron los linfocitos y se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) (1.200 rpm, 7 min). Posteriormente, se hicieron los tratamientos respectivos como se describe en la figura 1.

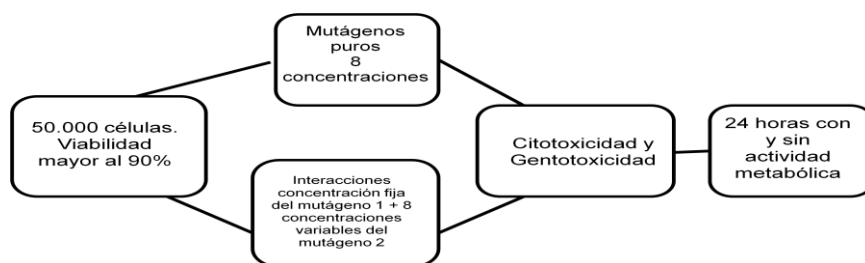


Figura 1. Diseño de los tratamientos celulares con los mutágenos puros B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX. Como control negativo se utilizó DMSO (1%) y como control positivo H₂O₂ (50 µM).

5 x 10⁴ células se sometieron a una exposición continua de 24 h, con el fin de determinar qué sucede después de un ciclo celular, en el cual se pueden activar diferentes procesos, tales como detoxificación de xenobióticos, sistemas de reparación, muerte celular, entre otros. Además, cada tratamiento se hizo en presencia o no de un sistema metabólico exógeno (fracción microsomal S9).

Citotoxicidad y genotoxicidad

Las concentraciones usadas para las pruebas de citotoxicidad (viabilidad) y genotoxicidad de los compuestos puros fueron:

B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX	0.01, 0.1, 1, 10, 20, 40, 50 y 100 μ M
Control negativo:	RPMI-1640, PBS y DMSO (1%)
Control positivo	H ₂ O ₂ (50 μ M).

Para las interacciones las concentraciones fueron:

Mutágeno fijo	Mutágeno variable
1 μM	
B[a]P	DMBA, Trp-P1, MX 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m
DMBA	B[a]P, Trp-P1, MX 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m
Trp-P1	B[a]P, DMBA, MX 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m
MX	B[a]P, DMBA, Trp-P1 0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40, 50 y 100 μ m

Ensayo de citotoxicidad y selección de concentración del compuesto fijo para las interacciones.

Con el fin de evitar falsos positivos en la genotoxicidad, se tuvo en cuenta para los análisis de las interacciones aquella concentración del compuesto fijo que luego de 24 h de exposición sin actividad metabólica, presentara una citotoxicidad máxima de un 40 \pm 5% (citotoxicidad moderada), ya que los efectos genotóxicos pueden estar asociados con citotoxicidad nula a moderada (17).

La viabilidad se determinó utilizando el colorante de exclusión azul tripano, que se basa en que las células muertas pierden la capacidad de permeabilidad selectiva y por lo tanto el colorante ingresa por difusión a ellas adquiriendo una coloración azul, en contraste, las células vivas son refringentes y selectivas al colorante. La cuantificación de la citotoxicidad se evaluó con doble ciego.

Evaluación genotóxica a través de electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa alcalino).

Una vez determinada la concentración de los compuestos puros a 24 h de exposición en la cual la citotoxicidad fuera inferior al 40%, se buscó el LOAEL genotóxico **común** a todos los mutágenos y se realizaron las mezclas binarias de la siguiente manera: se dejó fija la concentración correspondiente al LOAEL genotóxico común a cada uno de los mutágenos y se variaron las concentraciones del segundo mutágeno y viceversa (ver esquema anterior). Esto se realizó con el fin de dilucidar a cuál de los mutágenos se le atribuye el efecto generado en la mezcla binaria. La genotoxicidad se evaluó por medio del ensayo cometa alcalino que se basa en que los daños en el ADN nuclear generados por un agente genotóxico que no causa ligamientos cruzados, produce fragmentos de ADN de bajo peso molecular, generados por quiebres directos de cadena doble o sencilla o indirectamente por reparación por escisión incompleta o por la formación de sitios lábiles al álcali. Estos fragmentos de ADN se liberan durante el período de desenrollamiento alcalino y generan la cola del cometa durante la electroforesis. El ADN de alto peso molecular no migra y forma la cabeza del cometa, así mientras mayor sea el daño y la fragmentación generados por el compuesto genotóxico, mayor será la longitud de la cola del cometa.

Para detectar el daño en el ADN se utilizó electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa alcalino). Se siguió el protocolo propuesto por Tice (18), en resumen, se tomaron 20 μL de cada suspensión celular y se mezclaron con 80 μL de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%, 37°C), en PBS libre de calcio y magnesio, con el fin de formar una suspensión de células en agarosa. 100 μL de cada suspensión se colocó en un porta objetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal (1%), luego de poner los cubreobjetos, se llevaron las placas a 4°C para permitir la solidificación de la agarosa. Al finalizar el tiempo, se retiraron los cubreobjetos y se adicionó la tercera capa de agarosa (100 μL de agarosa de bajo punto de fusión), de nuevo se llevaron a 4°C para su solidificación. Después de remover los cubreobjetos, las muestras se sometieron a solución de lisis recién preparada (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM de Tris, 10 g/L de N-Lauril sarcosinato de sodio y 1% de Tritón X-100 a un pH de 10, ajustado con NaOH) a 4°C, durante 1 hora. Al finalizar este tiempo, las placas se lavaron con PBS y para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión de los sitios lábiles al álcali se cubrieron con buffer de electroforesis (300 mM de NaOH y 1 mM de Na₂EDTA a pH=13) por 20 minutos. Posteriormente, se corrió la electroforesis por 30 minutos, a 25 mV (1.1 V/cm) y 300 mA. Luego, las placas fueron neutralizadas sometiéndolas a tres lavados durante 5 minutos con buffer neutralizante frío (0.4 M de Tris buffer a pH=7.5 con HCl), se fijaron con metanol y se guardaron a 4°C en un ambiente de baja humedad, hasta su lectura. Cada placa se coloreo con bromuro de etidio (BrEt, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un microscopio de fluorescencia (Nikon), con filtro verde y con un objetivo de 40X. Los parámetros validados para determinar daño evaluado a través de este ensayo son: Migración del ADN,

concentración de ADN en la cola, momento de cola, momento Olive, entre otros (18), en esta investigación se usó como parámetro de medida la longitud de cola (μm). El criterio para determinar daño genético fue la media del control más una desviación estándar más uno ($X \pm DS + 1$) y de acuerdo a este valor se clasificó arbitrariamente el tipo de daño (TD) en cinco categorías: TD=0, células sin daño (0-18 μm); TD=1, células con daño bajo (19-37 μm); TD=2, células con daño medio (38-56 μm); TD=3, células con daño alto (57-75 μm) y TD=4, células con daño total (mayor a 75 μm). Otro parámetro que se tuvo en cuenta para los análisis de genotoxicidad fue la frecuencia de células dañadas en cada tratamiento y cada lectura se hizo con doble ciego.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes cada uno por duplicado y de cada tratamiento se contabilizaron 80 células (40 de cada placa), para un total de 240 células por tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto para los compuestos puros como para las mezclas, se determinó homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene y para establecer la normalidad se utilizó Kolmogorov-Smirnov. Si el comportamiento de los datos es paramétrico, se aplica Análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon, para datos no paramétricos. Para comparar el efecto genotóxico (longitud de cola en μm) de las mezclas binarias de los mutágenos se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA) bifactorial (mezcla y concentración). Se consideraron nueve concentraciones codificadas de 0 a 8, siendo 0 la dosis correspondiente al control negativo (DMSO, 1%). Las comparaciones múltiples de medias para los mutágenos, se realizaron con la prueba de Newman-Keuls, con un $\alpha = 0.05$. Para determinar efecto de dosis, se realizó un Análisis de Regresión simple con una $p < 0.05$.

Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Selección de la concentración del compuesto fijo para las interacciones.

La citotoxicidad en linfocitos humanos expuestos durante 24 h a las diferentes concentraciones evaluadas de los mutágenos B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica fue de nula a moderada, en cambio con actividad metabólica, la citotoxicidad fue moderada hasta 1 μM y alta en las demás concentraciones (cuadro 1), Como los efectos genotóxicos pueden estar asociados con citotoxicidad nula a moderada (Platel *et al.*, 2010), la concentración mínima

genotóxica en la cual se observan efectos adversos (LOAEL) genotóxicos común a los cuatro compuestos sin S9 fue de 1 μ M, por lo tanto, está fue la concentración seleccionada para mantener el compuesto fijo que se utilizó en cada mezcla binaria (cuadro 1).

Citotoxicidad de las Mezclas binarias.

Las mezclas binarias con y sin actividad metabólica en general produjeron una altísima citotoxicidad con excepción de las mezclas DMBA+MX variable con y sin actividad metabólica y Trp-P-1+MX variable con actividad metabólica (LOAEL, cuadro 2).

Genotoxicidad de las mezclas binarias

En el cuadro de 3 se presentan las mezclas binarias en las cuales hubo interacción con y sin actividad metabólica.

Sin S9 se presenta interacción **sinérgica** entre DMBA+MX variable desde la concentración menor, con un aumento en la genotoxicidad de 1.5 veces, hasta 9 veces la frecuencia de células dañadas y tipo de daño bajo. Esta mezcla presentó citotoxicidad total en la concentración más alta (cuadro 3, figura 2). Con actividad metabólica se observó una **tendencia antagónica** no significativa, observada en una leve disminución de la longitud de cola y en la frecuencia de células dañadas entre Trp-P-1+MX variable desde 0.01 hasta 20 μ M, a partir de 40 μ M la mezcla fue citotóxica. La combinación DMBA+MX variable presentó antagonismo desde 40 μ M, la longitud de cola disminuyó aproximadamente 1 vez, la frecuencia de células con daño disminuyó en un 50%, la citotoxicidad fue menor del 30% y el tipo de daño se mantuvo bajo (cuadro 3, figura 3).

Efecto de dosis de las interacciones

En el cuadro 4 se observa el efecto de dosis obtenido mediante un análisis de regresión simple de las mezclas binarias que presentaron interacción genotóxica. En general se observó un incremento en la longitud de cola relacionado con la dosis (cuadro 4), con un coeficiente de correlación superior al 90% (cuadro 4).

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto genotóxico en el ADN de linfocitos humanos producido por la interacción de mezclas binarias de cuatro mutágenos, con el fin de tener una aproximación en comprender como es el comportamiento de las mezclas para aportar así al posible análisis de riesgo de las mezclas complejas. Un estudio de análisis de riesgo comprende, entre otras: la identificación del peligro, el análisis de dosis respuesta (determinación de umbral) y de exposición y la caracterización del riesgo (19). En esta investigación se encontró diferente

respuesta entre las mezclas binarias de B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX en linfocitos humanos como no efecto, citotoxicidad, sinergismo o antagonismo como se analiza a continuación. A pesar de que los compuestos utilizados son mutágenos y presentaron actividad genotóxica individualmente (cuadro 1), todas las mezclas binarias evaluadas presentaron algún efecto (cuadro 2).

La gran mayoría de las mezclas analizadas durante 24 de exposición presentaron efecto citotóxico, igual que los compuestos puros con y sin actividad metabólica (cuadros 1 y 2). El LOAEL citotóxico es general desde la dosis de 0.01 μ M, o sea, con las concentraciones analizadas no se observa umbral no citotóxico (NOAEL cuadro 3). Aunque los dos hidrocarburos B[a]P y DMBA no son citotóxicos individualmente en las concentraciones evaluadas, las mezclas entre ellos presentaron la mayor toxicidad. Esto puede ser debido a que muchos hidrocarburos se unen al receptor aril hidrocarburo e inducen otros blancos del receptor aril hidrocarburo, aparte de los promotores del p450 (20), por ejemplo activar vías alternativas de toxicidad (21) o porque los HPA aumentan la actividad metabólica de ellos mismos y de otros generando metabolitos activos altamente tóxicos (22). Estos resultados también se explican porque a las 24 h las células continúan en el ciclo celular pero todo el tiempo expuestas a los mutágenos individuales o a la mezcla, debido a la agresión constante sobre el ADN se activan las vías de P53, de control y detención del ciclo celular, llevando a inducción de apoptosis o muerte celular con el fin de eliminar células dañadas con lesiones del ADN que no fueron reparadas exitosamente (16, 23). El incremento de la muerte celular y la disminución de reparación promotora de errores pueden reflejar una estrategia por la cual la célula escapa a la mutación a bajas dosis (16).

Las interacciones genotóxicas observadas se dieron entre el DMBA y la amina con la furanona MX. Sin actividad metabólica se observó una **potenciación** del DMBA por el MX (cuadro 3), esto puede ser debido a que el DMBA induce la síntesis de CYP 1A1 que es quien lo metaboliza y que se expresa en los linfocitos, la furanona es de acción directa y no requiere del metabolismo para su acción genotóxica por lo tanto la actividad, es posible que la furanona active vías de inducción del receptor aryl hidrocarburo, el cual se une a los PAH, translocándose al núcleo y convirtiéndose en un factor de transcripción para la producción de más CYP1A1, que es quien lo metaboliza, aumentando de esta manera los metabolitos activos (24).

El antagonismo que se presentó se debe a que se presente una modulación en la inducción enzimática que lleve a que uno de los mutágenos individuales pueda ser un potente agonista de los receptores o la mezcla afecta la capacidad de inducción de los citocromos evitando así la activación de los mutágenos indirectos (24). Además, los componentes de una mezcla pueden interactuar en un gran número de vías sobre un mismo sitio común semejante a un receptor o a una enzima. O ambos se pueden unir sin activar la enzima o unirse a ella con una disociación

constante y lenta. La inhibición de enzimas del citocromo por HPA individuales pueden influir la activación de otros procarcinógenos (24).

Uno de los pasos en el análisis de riesgo son las evaluaciones de dosis-respuesta del mutágeno con el fin de determinar o no umbrales genotóxicos, en este trabajo se hace una aproximación de este tipo de análisis. En la cuadro 4 y figuras 2 y 3 se presenta la relación dosis-respuesta de las interacciones genotóxicas sinérgicas que indujeron las mezclas binarias. En algunas mezclas se puede observar efecto dosis-respuesta desde la concentración más baja empleada, mientras que otras presentan este efecto a partir de concentraciones más altas, afirmando los modelos dosis-respuesta genotóxicos en los cuales se presenta un umbral para el efecto (25). En esta investigación se hace un aporte importante en el abordaje para entender los procesos que pueden ocurrir cuando en una mezcla hay presente mínimo dos mutágenos. El diseño establecido permitió evaluar mezclas binarias a bajas dosis y se pudo atribuir a cuál de los compuestos se debe el efecto, ya que en las mezclas los mutágenos pueden actuar combinadamente alterando la expresión de genes, alterando el metabolismo o producción de reguladores celulares o cambiando los niveles de concentración intracelular de iones. En realidad muy pocos mutágenos tienen un blanco celular único, muchos actúan en múltiples órganos o pueden tener diversos blancos dentro de la misma célula, o es posible que una célula no sea el blanco para ese compuesto (24). Lo importante de este diseño es que puede ser aplicado para tener un acercamiento de lo que puede estar ocurriendo en una mezcla, para estimar el riesgo se deben entender los mecanismos celulares y moleculares que determinan el fenómeno toxicológico o genotóxico expresado y cuantificar la dosis que se absorbe del compuesto químico y la magnitud de la respuesta. Determinar la concentración del mutágeno en la mezcla representa un punto crítico para el análisis, en este estudio se demuestra que la concentración de cada mutágeno en la mezcla es determinante para la producción del efecto. Los resultados de esta investigación sugieren que no necesariamente la presencia de dos mutágenos en una mezcla implica un riesgo, sino que es necesario determinar si esto ocurre con todos los componentes de una mezcla a qué concentración y qué procesos o mecanismos están determinando este tipo de interacciones.

En conclusión, debido a la dificultad de determinar como un contaminante interactúa con el resto de componentes de una mezcla y que este campo es poco explorado pero crece en importancia, este trabajo hace un aporte al análisis de riesgo de las mezclas validando un modelo de análisis que permite dilucidar cuál compuesto tiene el efecto sobre otro y también se demostró que según el tipo de compuestos en la mezcla se tendrá o no un umbral de riesgo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Colciencias, la Universidad Pontificia Bolivariana y la Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández J, Segura A, Cruces-Blanco C, Fernández A. Highly sensitive and selective fluorescent optosensor to detect and quantify benzo(a)pyrene in water samples. *Analytica Chimica Acta*. 2004; 506:1-7.
2. Felton J, Malfatti M, Knize M, Salmon C, Hpmans E, Wu R. Health risks of heterocyclic amines. *Mutat Res*. 1997; 376:37-41.
3. DeMarini D, Landi S, Ohe T, Shaughnessy D, Franzén R, Richard A. Mutation spectra in *Salmonella* of analogues of MX: implications of chemical structure for mutational mechanisms. *Mutat Res*. 2000; 453:51-65.
4. Onstad G, Weinberg H. Evaluation of the stability and analysis of halogenated furanones in disinfected drinking waters. *Anal Chim Acta*. 2005; 534:281-292.
5. Ioannides C. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. (Current Toxicology Series). Edited John Wiley and Sons. 2001. 554p.
6. Poirier M and Beland F. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem. Res. Toxicol*. 1992; 5: 749 – 55.
7. Kakizoe T. Chemoprevention of Cancer – Focusing on Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol*. 2003; 33(9):421–442.
8. Ogawa S, Hirayama T, Nohara M, Tokuda M, Hirai K, Fukui S. The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene in *Salmonella typhimurium* strains. *Mutat Res*. 1985; 142:103-107.
9. Wakabayashi K, Totsuka Y, Fukutome K, Oguri A, Ushiyama H, Sugimura T. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolines. *Mutat Res*. 1997; 376:253-259.
10. Salamote M, Heddle J, Katz M. The use of the *Salmonella*/microsomal assay to determine mutagenicity in paired chemical mixtures. *Can J Genet Cytol*. 1979; 21:101-107.
11. Hermann M. Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixture. *Mutat Res*. 1981; 90:399-409.
12. Boysen G, Hecht S. Analysis of DNA and protein adducts of Benzo(a)pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat Res*. 2003; 543:17-30.
13. ICH Expert Working Group. S2A: guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals. In: Proceedings: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH; 1995.
14. Hamilton J. Chemical mutagenesis and carcinogenesis. In: Bertino J, editor. Encyclopedia of cancer. 2. ed. New York: Academic Press; 2002. p. 433-447.

15. IWGT, 2009. 5th International Workshop on Genotoxicity Testing. August 17–19, Biozentrum of the University of Basel, Switzerland. Available from: <www.pharmazentrum.unibas.ch>.
16. National Research Council: Complex Mixtures. Method for *in vivo* toxicity testing. National Academy Press. Committee on Methods for the *in vivo* toxicity testing of complex mixtures. Board on environmental studies and toxicology commission on life sciences. Washington D.C. 1988.
17. Platel A, Gervais V, Sajot N, Nessler F, Marzin D, Claude N. Study of gene expression profiles in TK6 human cells exposed to DNA-oxidizing agents. *Mutat Res/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2010.
18. Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, and Sasaki Y. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000; 35:206-221
19. Environmental Protection Agency (EPA). Guidelines for mutagenicity risk assessment. Published on September 24, 1986, Federal Register 51(185):34006-34012. Risk Assessment Forum. U.S., Washington, DC.).
20. Hestermann E, Stegeman J, Hahn M. Relationships among the cell cycle, cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression in PLHC-1 cells. *Aquatic Toxicology*. 2002; 58(3 y 4):201-203.
21. Pottenger L, Gollapudi B. A case for a new paradigm in genetic toxicology testing. *Mutat Res*. 2009; 148-151.
22. Spink D, Wu S, Spink B, Mirza M, Hussain, Dilip D, Vakharia, Brian T, Pentecost, Laurence S, Kaminsky. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008; 226: 213–224.
23. Dalton W, Yu B, Yang V. p53 suppresses structural chromosome instability after mitotic arrest in human cells. *Oncogen*. 2010; 29:1929-1940.
24. Hahn M. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions*. 2002; 141(1 y 2):131-160.
25. Kirsch-Volders M, Gonzalez L, Carmichael P, Kirkland D. Risk assessment of genotoxic mutagens with thresholds: A brief introduction. *Mutat Res*. 2009. 678:72-75.

Figuras y cuadros

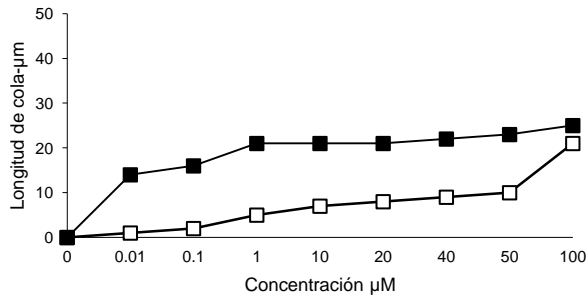


Figura 2. Genotoxicidad por interacción sinérgica a 24 h de exposición en linfocitos humanos tratados con a) DMBA, MX (□), DMBA (1 μM)+MX (■) sin actividad metabólica. La magnitud del daño se basó en la longitud de migración (μm) del ADN. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO, 1%) como control negativo, produjo una longitud de cola de 15 μm . A cada valor se le restó el control.

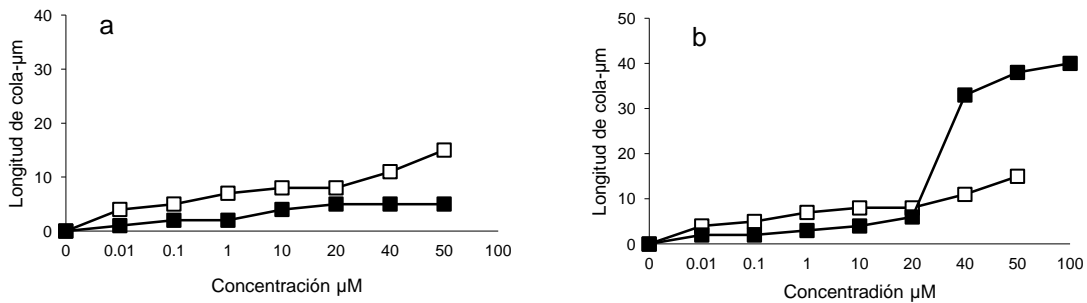


Figura 3. Genotoxicidad por interacción antagónica durante 24 h de exposición en linfocitos humanos tratados con a) DMBA, MX (□): DMBA (1 μM)+MX (■). b) Trp-P-1, MX (□), Trp-P-1 (1 μM)+MX (■) con actividad metabólica. La magnitud del daño se basó en la longitud de migración (μm) del ADN. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO, 1%) como control negativo, produjo una longitud de cola de 15 μm . A cada valor se le restó el control.

Cuadro 1. Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos tratados con B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica, durante 24 h.

Compuesto	Concentración μM	X±DS		TD		% CD		% V	
		—S9	+S9	—S9	+S9	—S9	+S9	—S9	+S9
DMSO 1%	0	15±3	15±2	0	0	15	13	100	98
	H ₂ O ₂	78±9	80±10	4	4	80	85	45	40
BP	0.01	16±4	26±4	0	1	8	61	97	74
	0.10	17±7	29±5	0	1	9	75	96	60
	1.00	20±1*	31±4	1	1	11	84	94	0
	10.00	20±1	32±3	1	1	29	85	93	0
	20.00	20±1	38±2	1	2	51	96	94	0
	40.00	21±1	40±4	1	2	54	99	94	0
	50.00	22±1	40±5	1	2	61	100	87	0
	100.00	48±4	46±7	2	2	100	100	77	0
	DMBA	0.01	14±4	28±4	0	1	6	66	96
0.10		19±4	36±3	1	1	25	98	85	0
1.00		28±6*	41±5	1	2	64	99	65	0
10.00		31±5	41±6	1	2	90	100	30	0
20.00		44±8	43±5	2	2	100	100	0	0
40.00		49±9	43±3	2	2	100	100	0	0
50.00		50±9	45±9	2	2	100	100	0	0
100.00		51±9	46±8	2	2	100	100	0	0
Trp-P-1	0.01	19±3	22±3	1	1	20	53	100	75
	0.10	19±5	24±7	1	1	24	61	50	59
	1.00	20±1*	24±6	1	1	35	65	46	44
	10.00	31±5	25±6	1	1	94	69	0	40
	20.00	46±6	28±6	2	1	100	84	0	34
	40.00	51±4	34±9	2	1	100	81	0	20
	50.00	ND	38±10		2	ND	85	0	0
	100.00	ND	57±10		3	ND	100	0	0
MX	0.01	16±4	19±3	0	1	6	8	100	83
	0.10	17±4	20±5	0	1	14	19	100	83
	1.00	21±1*	22±2	1	1	39	35	100	83
	10.00	22±2	23±3	1	1	43	40	100	74
	20.00	23±1	23±2	1	1	48	41	91	58
	40.00	24±2	26±5	1	1	56	74	88	54
	50.00	25±3	30±6	1	1	63	78	91	48
	100.00	36±4	49±5	1	2	100	99	83	19

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado. Se considera que una célula está dañada a partir de 19 μm (X control+1DS+1).

X \pm DS: Longitud de cola (μm) \pm desviación estándar.

TD: Tipo de daño

% CD: Porcentaje de células con daño

% V: Porcentaje de viabilidad.

*: p<0.001

Cuadro 2. Citotoxicidad de las mezclas binarias en linfocitos humanos expuestos durante 24 h con y sin actividad metabólica.

S9	Mezcla	NOAEL del compuesto variable (μM)	LOAEL del compuesto variable (μM)
-	B[a]P+DMBA	-	0.01
	Trp-P-1+DMBA	-	0.01
	B[a]P+Trp-P-1	-	0.01
	Trp-P-1+B[a]P	10	20
-	B[a]P+MX	0.01	0.1
	DMBA+ B[a]P	-	0.01
	MX+ B[a]P	10	20
	MX+DMBA	-	0.01
	MX+Trp-P-1	-	0.01
+	B[a]P+DMBA	-	0.01
	B[a]P+Trp-P-1	-	0.01
	B[a]P+MX	-	0.01
	DMBA+B[a]P	-	0.01
	DMBA+Trp-P-1	-	0.01
-	Trp-P-1+DMBA	-	0.01
	Trp-P-1+B[a]P	10	20
	MX+ B[a]P	10	20
	MX+DMBA	-	0.01
	MX+ Trp-P-1	20	40

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado. NOAEL: Máxima concentración en la cual no se observan efectos adversos citotóxicos. LOAEL: Mínima concentración en la cual se observan efectos adversos citotóxicos.

Cuadro 4. Efecto de dosis de las mezclas binarias que presentaron interacción genotóxica.

	24 h
Mezcla	Con S9
DMBA-MX	$Y = \sqrt{(a+b \cdot X^2)}$ * $R^2=98.5\%$
Trp-MX	$Y = \sqrt{(a+b \cdot X^2)}$ * $R^2=98.3$

Los resultados son obtenidos de un análisis de regresión simple.

* $p < 0.001$ significancia de la ecuación que explica que el modelo utilizado para el análisis de regresión simple es adecuado para el tipo de datos obtenidos.

Cuadro 3. Genotoxicidad de mezclas binarias en linfocitos humanos tratados con B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica (S9) durante 24 h de exposición.

Actividad metabólica	Compuesto fijo (1µM) (X ±DS), (TD), (%CD), (%V)	Compuesto variable	Concentración (µM)	Genotoxicidad compuesto				Genotoxicidad mezcla				Interacción
				(X±DS) µm	TD	%CD	%V	(X±DS)	TD	%CD	%V	
Control	DMSO	—	1%	15±3	0	15	100	—	—	—	—	—
Sin S9	DMBA (28±6), (1), (64), (65)	MX	0.01	16±4	0	6	100	29±10	1	56	100	<i>Sinergismo*</i>
			0.1	17±4	0	14	100	31±12	1	64	87	
			1	21±1	1	39	100	36±13	1	81	70	
			10	22±2	1	43	100	36±10	1	95	70	
			20	23±1	1	48	91	36±8	1	98	72	
			40	24±2	1	56	88	37±20	1	63	70	
			50	25±3	1	63	91	38±8	2	96	62	
			100	36±4	1	100	83	69±5	2	98	0	citotóxica

Continuación cuadro 3.

Actividad metabólica	Compuesto fijo (1µM) (X±DS), (TD), (%CD), (%V)	Compuesto variable	Concentración (UM)	Genotoxicidad compuesto				Genotoxicidad mezcla				Interacción
				(X±DS)	TD	%CD	%V	(X±DS)	TD	%CD	%V	
Con S9	Trp P1 (24±6), (1), (65), (44)	MX	0.01	19±3	1	8	83	17±8	0	19	72	Tendencia antagónica
			0.1	20±5	1	19	83	17±6	0	21	71	
			1	22±2	1	35	83	18±6	1	21	62	
			10	23±3	1	40	74	19±6	1	25	62	
			20	23±2	1	41	58	21±9	1	35	61	
			40	26±5	1	74	54	48±9	2	89	51	
			50	30±6	1	78	48	53±9	2	99	39	
	100	49±5	2	99	19	55±10	2	98	35			
	DMBA (41±5), (2), (99), (100)	MX	0.01	19±3	1	8	83	16±5	0	10	93	ND
			0.1	20±5	1	19	83	17±4	0	11	93	
			1	22±2	1	35	83	17±4	0	13	87	
			10	23±3	1	40	74	19±4	1	21	75	
			20	23±2	1	41	58	20±5	1	23	80	
			40	26±5	1	74	54	20±5	1	31	81	Antagonismo*
50			30±6	1	78	48	20±9	1	24	64		
100	49±5	2	99	19	34±10	1	74	64				

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado.

X±DS: Longitud de cola ± desviación estándar.

TD: Tipo de daño

% CD: Porcentaje de células con daño

% V: Porcentaje de viabilidad.

*: p<0.001

ND: Efecto no detectable

APPENDIX 14: PRIMARY POLLUTANTS

Nitrogen dioxide (NO₂)¹ is formed in combustion emissions from vehicles and power plants. The emissions can be reduced by optimization of the combustion process (low NO_x burners in power plants and lean burn motors in motor vehicles) or by means of catalytic converters in the exhaust. NO₂ also contributes to the formation of ground-level ozone and particulate matter.

Ground-level ozone² (main component of smog) is not directly emitted, but formed through a chemical reaction of nitrogen oxides (NO_x) and volatile organic compounds (VOC) in the presence of sunlight. It is most commonly observed on hot summer days in urban (polluted) environments, but can be present at any time of the year and can be transported by wind to rural areas. Measures taken to reduce emissions of NO_x and VOC will also lead to reduced levels of ground-level ozone. Children are recognized as being at greatest risk from exposure to ozone because of their still-developing lungs and increased outdoor activity.

Particulate matter (PM)³ is a complex mixture of solid particles and liquid droplets. Particulate matter is divided into two categories based on size: (1) inhalable course particles between 2.5µm and 10µm (PM₁₀) and (2) fine particles smaller than 2.5µm (PM_{2.5}). PM is both emitted directly from sources (e.g., smokestacks, fires, construction sites) and formed through a chemical reaction of other emissions, including NO_x and sulfur dioxides (SO₂). Particles less than 10µm pose the greatest threat to health because they are able to travel further into the lungs. No adverse health impacts have been observed for course particles greater than 10µm.⁴

Sulfur Dioxide (SO₂)⁵ is a highly reactive gas emitted in combustion. The primary sources of SO₂ are fossil fuel power plants and industrial facilities.

Lead (Pb)⁶ as an additive to petrol has been phased out in the major part of the industrial world, but is still used in many developing countries and economies in transition, where emissions from industrial activities also play a role. Once lead has entered the body, it is distributed through the blood and accumulated in bones. “Lead can adversely affect the nervous system, kidney function, immune system, reproductive and developmental systems and the cardiovascular system.” The WHO guidelines do not include lead.

¹ *Nitrogen Dioxide*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/airquality/nitrogenoxides/> (last visited Nov. 26, 2013).

² *Ground-level Ozone*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/glo/basic.html> (last visited Nov. 26, 2013).

³ *Particulate Matter (PM) Basic Information*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/pm/basic.html> (last visited Nov. 26, 2013); *Particulate Matter (PM) Health*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/airquality/particlepollution/health.html> (last visited Nov. 26, 2013)

⁴ Fenger, *supra* note **Error! Bookmark not defined.**, at 4986.

⁵ *Sulfur Dioxide*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/airquality/sulfurdioxide/> (last visited Nov. 24, 2013).

⁶ *Lead: Health*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/airquality/lead/health.html>.

Carbon monoxide (CO)⁷ is emitted from combustion. In urban environments, the primary source of CO is from motor vehicles. The emissions can be reduced by increasing the air/fuel ratio, but with the risk of increasing the formation of nitrogen oxides. Most effective reductions are carried out with catalytic converters. CO reduces the oxygen-carrying capacity of the blood thereby reducing the delivery of oxygen to the body's organs. The WHO guidelines do not include CO.

Soot is particulate matter 2.5µm or smaller emitted from combustion of fossil fuels.

Hexavalent Chromium (Cr VI)⁸ is produced by industrial processes and is associated with bronchitis, decreased pulmonary function, pneumonia, and other respiratory effects. Cr VI is also a known human carcinogen.

Cadmium⁹ is emitted from combustion of fossil fuels or the incineration of municipal waste. Acute exposure through inhalation is associated with pulmonary irritation, while oral exposure of long-term exposure through inhalation is associated with kidney disease. The U.S. EPA has classified cadmium as a probable human carcinogen.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)¹⁰ are emitted with incomplete combustion of coal, oil, gas, and garbage. PAHs are of particular concern because they are not easily burned and can remain in the environment for long periods of time. These chemicals can enter the body through inhalation, ingestion, or skin contact. Epidemiological studies of occupational exposure to PAHs indicate an association with increased incidences of lung, skin, and bladder cancers.¹¹ The WHO guidelines do not include PAHs.

Benzo(a)pyrene (BaP)¹² is a polycyclic aromatic hydrocarbon (*see* PAHs) There are no human studies that specifically link benzo(a)pyrene to cancer, it is a common component of PAHs which have been associated with human cancer. The International Agency for Research on Cancer (IARC) benzo(a)pyrene as a probable human carcinogen.

⁷ *Carbon Monoxide*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/airquality/carbonmonoxide/> (last visited Nov. 26, 2013).

⁸ *Chromium Compounds*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/chromium.html> (last revised Jan. 2000).

⁹ *Cadmium Compounds*, U.S. EPA, <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/cadmium.html> (last revised Jan. 2000).

¹⁰ U.S. EPA, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)* (2008), *available at* <http://www.epa.gov/wastes/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>.

¹¹ *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): What Health Effects are Associated with PAH Exposure?*, Agency for Toxic Substances & Disease Registry, <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=13&po=11> (last updated July 1, 2008).

¹² *Benzo(a)pyrene (BaP) (CASRN 50-32-8)*, U.S. EPA Integrated Risk Information System, <http://www.epa.gov/iris/subst/0136.htm> (last updated Aug. 9, 2012).

Benz(a)anthracene¹³ is a polycyclic aromatic hydrocarbon (*see* PAHs). There are no human studies that specifically link benzo(a)anthracene to cancer, it is a common component of PAHs which have been associated with human cancer. The International Agency for Research on Cancer (IARC) benzo(a)pyrene as a probable human carcinogen.

Heterocyclic Amines are indirect mutagens that induce mutation by loss or gain of bases, formed in the burned coast of protein foods fried and roasted. They can be in the water through the urine and feces of people who use them.

Furanones¹⁴ Some genotoxic compounds are produced during the disinfection of drinking water, as a result of the reaction of chlorine with organic substances (Meier, 1988). The 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone (MX) (Fig. 6) is the major mutagenic product resulting from water disinfection, identified to date (5000-13000 revertants / nmol), is responsible for 20 to 60% of the total mutagenicity found in drinking water and only found in nanogram quantities / liter (Onstad and Weinberg, 2005).

¹³ *Benz(a)anthracene* (CASRN 56-55-3), U.S. EPA Integrated Risk Information System, <http://www.epa.gov/iris/subst/0454.htm> (last updated Aug. 9, 2012).

¹⁴ Meier JR. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat Res.* 1988; 196:211-245; Onstad GD, Weinberg H. Evaluation of the stability and analysis of halogenated furanones in disinfected drinking waters. *Anal Chim Acta.* 2005; 534:281-292.

Comparación de la concentración de contaminantes OMS/EPA/Colombia

		EPA NAAQS			WHO AQG		Colombia Resolución 610/10	
Pollutant		Averaging Time	Level	Form	Level	Form	Level	Form
Nitrogen Dioxide		1-hour	100 ppb	98th percentile, averaged over 3 years	200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1-hour mean	200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1-hour mean
		Annual	53 ppb (2)	Annual Mean	40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Annual mean	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Annual mean
Ozone		8-hour	0.075 ppm (3)	Annual fourth-highest daily maximum 8-hr concentration, averaged over 3 years	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	8-hour mean	80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	8-hour mean
Particulate Pollution	PM _{2.5}	Annual	12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	annual mean, averaged over 3 years	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Annual mean	25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Annual mean
		24-hour	35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	98th percentile, averaged over 3 years	25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24-hour mean	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24-hour mean
	PM ₁₀	-	-	-	20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Annual mean	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Annual mean

		24-hour	150 µg/m³	Not to be exceeded more than once per year on average over 3 years	50 µg/m³	24-hour mean	100 µg/m³	24-hour mean
Sulfur Dioxide	1-hour	75 ppb (4)	99th percentile of 1-hour daily maximum concentrations, averaged over 3 years	20 µg/m³	24-hour mean	80 µg/m³	24-hour mean	
				500 µg/m³	10-minute mean	750 µg/m³	3-hour mean	

**Genotoxicidad sobre linfocitos humanos expuestos a PM₁₀ de tres sitios del
Valle de Aburrá (Antioquia)**

**Genotoxicity in human lymphocytes exposed to PM₁₀ from three sites of
Valle de Aburrá (Antioquia)**

Lady Carolina Mendoza Zapata¹, Luz Yaneth Orozco Jiménez², Lina María Zapata Restrepo³ & Jaime Alberto Palacio Baena⁴.

^{1,2,3,4}Universidad de Antioquia. Grupo de Gestión y Modelación Ambiental GAIA.
Línea de Genotoxicología y Epigenética Ambiental GEA.

¹Lady Carolina Mendoza Zapata. Cille 67 # 53-108 B20-138.
mendezapata@gmail.com. Universidad de Antioquia. Grupo de Gestión y
Modelación Ambiental GAIA. Línea de Genotoxicología y Epigenética Ambiental
GEA.

Resumen

Objetivo: Evaluar la calidad del aire en tres sitios del valle de aburrá (Antioquia) a través de la determinación de la genotoxicidad del PM₁₀ en linfocitos humanos.

Métodos: A partir del valor de referencia para Colombia (50 µg/m³) y del contenido de PM₁₀, se eligieron tres sitios del Valle de Aburrá, Barbosa, Corantioquia y Facultad de Minas, con un promedio anual de PM₁₀ bajo (25 µg/m³), medio (44 µg/m³) y alto (91 µg/m³), respectivamente. Los filtros de PM₁₀ se analizaron en la épocas de lluvia, transición y seca entre el 2011 y el 2012. Con el extracto orgánico obtenido en cada filtro se trataron linfocitos humanos para evaluar el daño en el ADN por medio del ensayo Cometa Alcalino.

Resultados: En todos los casos se encontró genotoxicidad altamente significativa ($p < 0.001$) respecto al control negativo, el mayor daño (seis veces mayor) se estableció en el tratamiento con el material procedente de Facultad de Minas y durante la época de transición. Se evidenciaron diferencias en la inducción de daño entre los materiales de Barbosa y Corantioquia con respecto a Facultad de Minas.

Conclusiones: Aunque los valores de PM₁₀ reportados para Barbosa y Corantioquia fueron inferiores al nivel máximo permisible, se encontró actividad genotóxica del PM₁₀ proveniente tanto de ellos como de Facultad de Minas. Estos resultados evidencian que únicamente el monitoreo fisicoquímico del material particulado es insuficiente para evaluar el riesgo sobre la población expuesta. Por ello, consideramos que estos análisis deben ser acompañados del empleo de biomarcadores de genotoxicidad como el ensayo cometa.

Palabras Clave: contaminación ambiental, biomarcadores, polucion aerea, marcadores de genotoxicidad.

Summary:

Objective: To assess the air quality through the determination of the PM10 genotoxicity in human lymphocytes, at three locations of Aburra Valley (Antioquia).

Methods: From Colombia reference value (50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and the content of PM10, three sites were chosen at the Aburrá Valley (Barbosa, Corantioquia and School of Mines), with an annual average of PM10 low (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), medium (44 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and high (91 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), respectively. PM10 filters were analyzed during three different seasons: rainy, transitional and dry, between 2011 and 2012. To evaluate DNA damage by alkaline comet assay, human lymphocytes were treated with the organic extract obtained in each filter.

Results: In all cases genotoxicity was found highly significant ($p < 0.001$) compared to the negative control. The highest damage (six times) was seen in the material from School of Mines and during the transitional period. Differences were found in the induction of damage between Barbosa and Corantioquia materials regarding to School of Mines.

Conclusions: Although the PM10 values reported for Barbosa and Corantioquia were below the maximum *permitted level*, genotoxic activity was found for PM10 from both sites as well as for the School of Mines. These results show that physicochemical monitoring of particulate matter is not enough to assess the risk to

the exposed population. Therefore, we believe that these analyzes should be accompanied by the use of biomarkers of genotoxicity, as the comet assay.

Keywords: Environmental pollution, air pollution, genotoxicity markers, biomarkers.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en la evaluación de los impactos de compuestos puros o de mezclas potencialmente genotóxicas y carcinogénicas, ya que estas sustancias generan a largo plazo, efectos adversos sobre la salud de los ecosistemas y de los humanos. La exposición a sustancias genotóxicas puede causar alteraciones tempranas previas al desarrollo de una enfermedad, que a su vez constituyen biomarcadores apropiados para el análisis de riesgo ambiental (1). Estos biomarcadores genotóxicos, son usados como una primera señal en un “sistema de alerta temprano” (2). A partir de estos hallazgos, algunas entidades de control ambiental han validado una serie de pruebas para la generación de información como insumo para el análisis de riesgo y las estrategias de regulación (3-4). En el ensayo cometa, una de las metodologías más usadas para detectar daño genómico, se evalúa la integridad del ADN. Este aspecto es fundamental para la salud de los organismos, ya que los quiebres o rupturas del ADN constituyen lesiones premutagénicas potenciales (5).

La industrialización y el aumento del tráfico vehicular han incrementado la exposición de la población humana a agentes potencialmente genotóxicos, que agreden mediante múltiples mecanismos el patrimonio genético (6). De acuerdo con Park & Choi (3) en Europa y Estados Unidos se ha registrado un aumento de enfermedades respiratorias y cardiovasculares asociadas con la contaminación atmosférica. Especialmente se ha encontrado una relación positiva entre la morbilidad y la mortalidad con altos niveles de partículas PM_{10} en centros urbanos (7). Las partículas menores de 10 micras, PM_{10} , resultan principalmente

de la combustión incompleta de diferentes tipos de combustibles y de fuentes industriales (8). Este material es inhalado a través de la respiración, puede depositarse en tráquea, bronquios y bronquiolos de animales y humanos. A este material se adhieren contaminantes orgánicos con conocida actividad mutacarcinógena como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), benceno, tolueno y compuestos inorgánicos tóxicos como sulfatos, nitratos, amonio y metales pesados (9).

Medellín es una urbe con alta contaminación atmosférica, debido a la obsolescencia e incremento del parque automotor, baja calidad del combustible utilizado, reducida cobertura vegetal en las vías principales e insuficiente control de las emisiones móviles e industriales (10). El monitoreo de la calidad del aire en el Valle del Aburrá se basa en el seguimiento de variables físico-químicas, pero aún se desconocen muchos efectos ecológicos y epidemiológicos ocasionados por el deterioro de la calidad del aire. En los últimos años se han monitoreado los niveles de contaminantes como: monóxido de carbono, dióxido de nitrógeno y de azufre, ozono, PM_{10} , $PM_{2.5}$ y partículas totales en suspensión (PST) en gran parte del Valle de Aburrá; pero aún se desconoce la composición del material particulado (MP) del Valle y los posibles efectos genotóxicos que permitan determinar el riesgo de forma temprana para la población expuesta.

Esta investigación busca establecer a través del ensayo cometa alcalino la actividad genotóxica del material particulado PM_{10} de tres sitios del Valle de Aburrá en células humanas y su relación con la época climática para implementarlo como parámetro de evaluación de la calidad del aire y caracterizar su potencial riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y sitios de muestreo

El valle de aburrá está ubicado en el departamento de Antioquia, a 1538 msnm, temperaturas entre los 13°C – 35°C y la precipitación media alcanza 2200 mm por año. Aunque los vientos característicos del Valle soplan generalmente de Norte a Sur, son modificados constantemente por la topografía (11).

De acuerdo con los resultados del monitoreo del material particulado de la Red Nacional de Vigilancia de la Calidad del Aire (REDAIRE) en el Valle del Aburrá, se eligieron tres sitios de muestreo con diferentes niveles de contaminación (Fig.1), para ver características de estos consultar tabla 1.

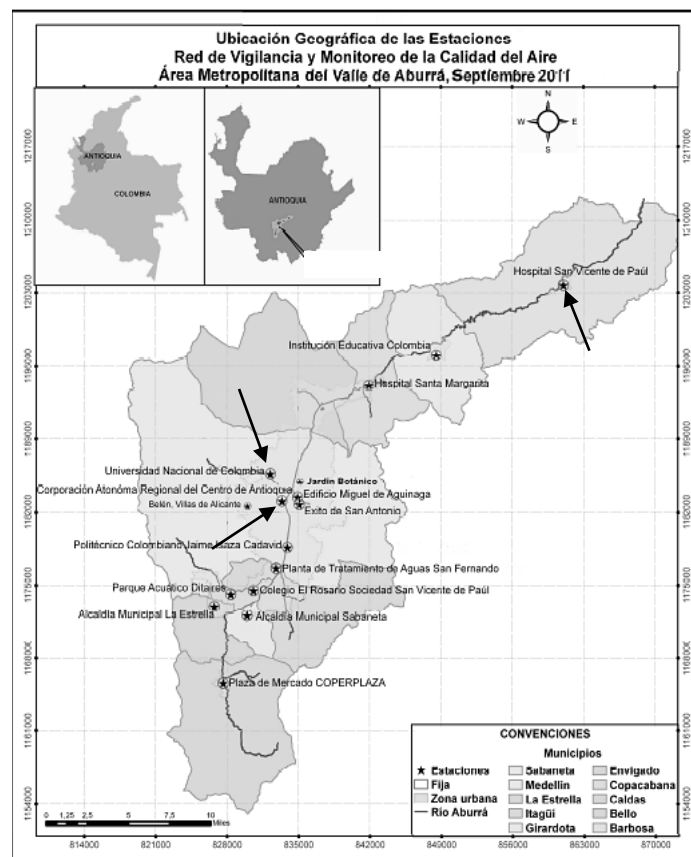


Figura 1. Mapa del Valle de Aburrá con los puntos de monitoreo (Estaciones de estudio señalados)

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo

SITIO		Barbosa		Corantioquia		Facultad de Minas		
Coordenadas		N06°26'20.8" W075° 20'11.3"		N06°15'08.9" W075° 35'09.9"		N06°16'39.5" W075° 35'42.9"		
Características de la zona		Zona semiurbana, hospital		Zona Urbana, alto tráfico de carro liviano		Zona urbana, universitaria, alto tráfico de carro pesado		
Altura del muestreador (metros con respecto al suelo)		7		12		3		
PM ₁₀ promedio (µg/m ³)**		31		45		72		
Época	Seca	Fecha	05/07/2011	31/01/2012	05/07/2011	31/01/2012	08/07/2011	31/01/2012
		PM ₁₀ (µg/m ³)	20	29	34	52	65	112
	Transición	Fecha	14/12/2011		14/12/2011		14/12/2011	
		PM ₁₀ (µg/m ³)	27		42		72	
	Lluvia	Fecha	21/10/2011	24/04/2012	21/10/2011	24/04/2012	21/10/2011	24/04/2012
		PM ₁₀ (µg/m ³)	27	19	41	53	50	175

** PM10 promedio es de la Temporada Julio 2011- Abril 2012 (Norma actual: 50 µg/m³ anual)

Obtención del material particulado PM₁₀

REDAIRE cuenta con muestreadores de alto volumen PM₁₀ a lo largo del Valle de Aburrá, estos equipos se fundamentan en el principio de impactación inercial para clasificar las partículas según el tamaño. Las partículas con diámetro ≤10µm son depositadas en filtros de cuarzo expuestos durante 24 horas.

Obtención del Material Orgánico Extraíble (MOE)

Para la obtención del MOE se siguió la metodología propuesta por Sato *et al.*, 1995 (12) con algunas modificaciones. Los filtros fragmentados se llevaron a recipientes de vidrio, se cubrieron con Diclorometano (DCM) como solvente

orgánico en proporción 2ml de DCM por cada g de PM₁₀ y se ultrasonicó durante una hora, con el fin de desprender los compuestos orgánicos adheridos a las partículas. Posteriormente, el solvente se rotaevaporó, se diluyó en PBS y se emulsionó por medio de una llave de tres vías acoplada a un sistema de dos jeringas y un filtro de 0.22 µm, con el fin de obtener una solución estéril para los ensayos celulares.

Citotoxicidad y ensayos celulares

A partir de 10 mL de sangre heparinizada se obtuvieron linfocitos humanos provenientes de un voluntario sano, con hábitos que no afectaran los resultados de la investigación como el consumo de tabaco, alcohol, deporte extremo, entre otros. Para la separación de las células se empleó el método de separación por gradiente con Ficoll Hystopaque (13). En la suspensión celular, se determinó la citotoxicidad usando el colorante vital azul de tripano en cámara de Neubauer, así: % citotoxicidad = (No. de células muertas / No. de células totales)*(100)

Los tratamientos con el MOE fueron realizados cuando la citotoxicidad fue menor al 10%.

Se trataron 100.000 linfocitos con 25, 50 y 100 µg equivalentes de PM₁₀ por una hora y solo las suspensiones celulares que presentaron citotoxicidad máxima de 25±5% se consideraron genotóxicas, ya que estos efectos están asociados a citotoxicidad nula a moderada (14). Con el MOE de cada filtro se realizaron dos experimentos independientes cada uno por duplicado para las tres dosis. A un filtro sin exposición a PM₁₀, utilizado como blanco, se le realizó el mismo procedimiento. El control negativo fueron células sin tratamiento y en el control positivo se trataron con peróxido de hidrógeno 100mM.

Evaluación Genotóxica del MOE por medio del ensayo Cometa Alcalino

Para visualizar las rupturas generadas por el MOE, se siguió el protocolo propuesto por Singh *et al.* (15) con las modificaciones necesarias para trabajar en gelbond (16). Inicialmente, se mezclaron 20 μ l de células tratadas con 80 μ l agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (DEACI), de esta mezcla se sembraron 10 μ l en la lámina del gelbond, luego de la solidificación a 4°C se llevaron a una solución lisis fresca (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, sarcosinato de sodio 1%, Triton X-100 y DMSO 10%) durante 24 h. Al concluir este periodo, las láminas se dejaron en buffer de electroforesis fresca (Na₂EDTA 1 mM y NaOH 300 mM a pH13.5) por 20 minutos para permitir la desnaturalización del ADN, luego se hizo el corrido electroforético a 25mV y 300mA (BIORAD Power Pac 3000) por 30 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad. Las láminas Gelbond se lavaron con solución neutralizante (Tris- HCl 0.4M a pH 7.5), se tiñeron con Bromuro de Etidio 2 μ l/ml y la lectura de los núcleos se realizó en un microscopio de fluorescencia marca Boeco, con filtro verde y magnificación de 20X. Se analizaron 100 células para cada tratamiento con el software Casp y los resultados se expresaron como longitud de cola del cometa (micrómetros). El criterio para determinar daño genético fue la media de la longitud de cola del control negativo más una desviación estándar más uno ($X \pm DS + 1$). De acuerdo a este valor, se clasificó arbitrariamente el tipo de daño (TD) en cinco categorías: TD=0 células sin daño; TD=1 células con daño bajo; TD=2 células con daño medio; TD=3 células con daño alto y TD=4 células con daño total. Con base en ellas se determinó el Índice de Daño Ponderado (IDP) por tratamiento, según la fórmula propuesta por Ferreiro *et al.* (17): $IDP = (n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)$. Donde:

IDP es el índice de Daño Ponderado

n1 a n4 el número de células por categoría.

Además se consideró el factor de inducción (FI) de daño, como el incremento relativo de la longitud de cola del tratamiento con relación a la longitud de cola del control (18), así:

$$FI_a = X_a / X_c.$$

Donde:

FI es el factor de inducción de la concentración o tratamiento a,

Xa corresponde al promedio de la longitud de cola de la concentración a,

Xc es el promedio de la longitud de cola del control negativo.

Otro parámetro que se incluyó para los análisis de genotoxicidad fue la frecuencia de células dañadas en cada tratamiento.

Análisis Estadísticos

Dado que el coeficiente de variación de los resultados fue <10%, se homogenizaron y se presentaron como la media \pm DS de la longitud de cola. La distribución de los datos se determinó mediante curtosis y simetría. Las diferencias de los resultados entre los sitios con respecto a las dosis de los tratamientos y las épocas climáticas se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La influencia de todos los factores (sitios, dosis y épocas climáticas) se determinó con la prueba de rangos múltiples. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Para los análisis se aplicó software StatGraphic Centurión XVI.

RESULTADOS

La citotoxicidad celular después de una hora de tratamiento fue menor al 30% para todos los tratamientos y en consecuencia, la actividad genotóxica se puede atribuir a la acción del MOE y no a otros factores de citotoxicidad.

Aunque en ningún caso se logró establecer una relación dosis-respuesta, el FI fue de tres a seis veces mayor en las células tratadas con MOE obtenido del PM₁₀ en comparación con el control ($p < 0.001$) (Tabla 2). El índice de daño ponderado (IDP) fue significativo para los tratamientos con el material procedente de los tres sitios y alcanzo valores de dos a diez veces mayores que el control negativo. La fracción de células con daño (%) osciló en Barbosa entre 39 y 79%, en Corantioquia entre 50 y 85% y en Facultad de Minas entre 73 y 93% (Fig. 2). Mientras el mayor daño se presentó en los tratamientos con material colectado durante la época de transición en los tres sitios de muestreo (Tabla 2), el menor se registró en el periodo seco.

Al comparar la genotoxicidad de los diferentes tratamientos con el material colectado en cada sitio y el control negativo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), es decir, los tratamientos con el material de los tres sitios resultaron genotóxicos independientemente de los niveles de PM₁₀ (Fig. 2). Aunque en ningún caso se logró establecer una relación dosis-respuesta, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre los tratamiento de 50 y 100 μg equivalentes de PM₁₀ y el tratamiento con 25 μg equivalente PM₁₀ con material de los tres sitios monitoreados.

Tabla 2. Genotoxicidad de PM₁₀ en linfocitos humanos

SITIO	EPOCA	DOSIS (µg equiv MP ₁₀)	X±DS ^a	IDP ^b	% CD ^c	FI ^d	% V ^e
Barbosa	Lluvia	25	20.4 ± 13.5	60	50	3	87.9
		50	22.0 ± 15.6	68	51	3	91.9
		100	25.3 ± 16.0	83	65	4	66.7
	Transición	25	34.9 ± 17.5	113	78	5	91.4
		50	35.6 ± 19.2	114	74	5	87.5
		100	39.8 ± 19.8	131	79	6	72.7
	Seca	25	15.6 ± 11.5	46	39	2	90.9
		50	32.3 ± 22.7	100	62	5	81.7
		100	29.0 ± 17.0	92	67	3	72.4
Corantioquia	Lluvia	25	28.0 ± 16.9	92	68	4	95
		50	29.2 ± 19.5	96	63	5	94
		100	34.9 ± 20.0	111	72	5	80
	Transición	25	26.0 ± 15.5	84	68	4	88
		50	37.7 ± 23.6	118	69	6	83
		100	35.1 ± 15.5	120	85	6	85
	Seca	25	26.1 ± 15.2	84	66	4	98.3
		50	30.3 ± 18.1	98	68	5	91.2
		100	22.1 ± 16.8	69	50	3	89.8
Fac. Minas	Lluvia	25	30.0 ± 15.0	97	73	5	75
		50	39.0 ± 19.2	122	80	6	71.4
		100	36.0 ± 21.5	117	73	6	59.1
	Transición	25	53.0 ± 22.0	129	93	9	95
		50	38.0 ± 17.0	129	84	6	95.7
		100	37.0 ± 22.0	122	74	6	95
	Seca	25	23.0 ± 16.0	75	57	4	100
		50	41.0 ± 20.0	133	81	6	94
		100	40.0 ± 23.0	133	74	6	94
Filtro blanco		100	10.0 ± 5.0	21	15	1	93.2
C- (PBS)			8.4 ± 6.0	15	15	1	97.1
C+ (H ₂ O ₂)		XmM	54.3 ± 39.0	167	77	7	77.5

^a Media de la longitud de cola del DNA de dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. ^b Índice de Daño Ponderado. ^c Porcentaje de Células Dañadas (se consideró daño a partir de 16 micras). ^d Factor de Inducción. ^e Porcentaje de Viabilidad después de 1 hora de exposición a PM₁₀

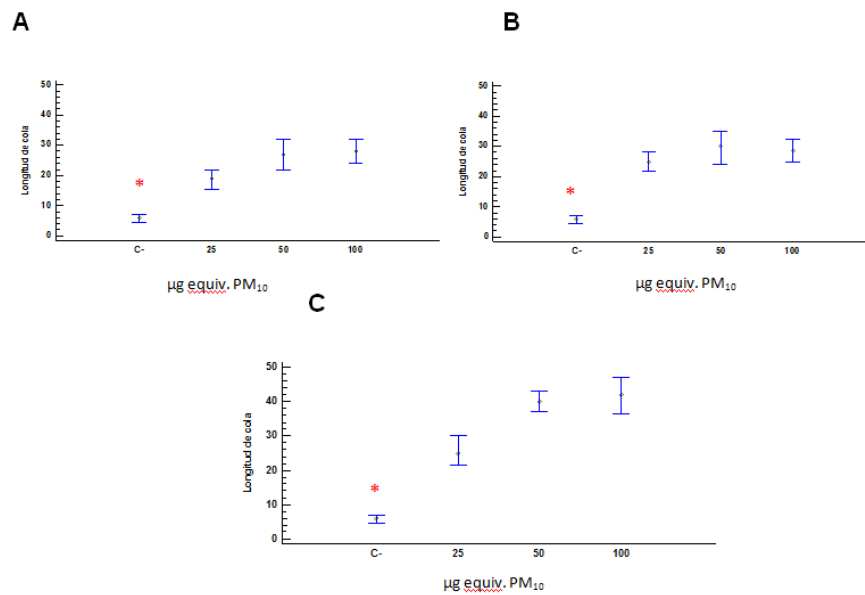


Figura 2. Medianas de la longitud de cola (daño) para las tres dosis en cada uno de los Sitios. * Diferencias estadísticamente significativas. C-, control negativo. A) Barbosa, B) Corantioquia, C) Facultad de Minas

No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad genotóxica del MOE colectado en Barbosa y en Corantioquia, pero entre estos y el efecto del MOE de Facultad de Minas se encontraron diferencias ($p < 0.001$) debido a una mayor genotoxicidad en este último sitio. Para las épocas climáticas se observó el mismo comportamiento, siendo 1.3 veces mayor la genotoxicidad del MOE en Facultad de minas (fig. 3).

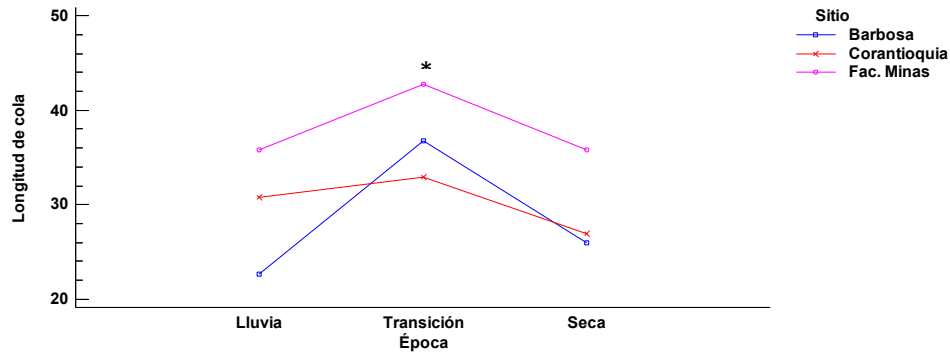


Figura 3. Gráfico de interacción de genotoxicidad entre los sitios y las épocas climáticas. * Diferencias significativas con respecto a los otros dos sitios ($p < 0.001$).

Al analizar la influencia de la época climática, se observó que durante la transición se incrementó la actividad genotóxica del MOE de los tres sitios ($p < 0.001$), principalmente de Barbosa con el cambio de valores medios de daño de $22.64 \mu\text{m}$ época seca a $25.94 \mu\text{m}$ en lluvia, a $36.78 \mu\text{m}$ en transición. En Facultad de Minas estos valores se incrementaron de $38.8 \mu\text{m}$ en las épocas seca y de lluvia a $43 \mu\text{m}$ en el periodo de transición.

DISCUSIÓN

Los días de muestreo representan el valor promedio anual de PM_{10} para cada sitio (19), por lo que los resultados arrojados en este estudio dan cuenta del riesgo al que frecuentemente están expuestos los habitantes del Valle de Aburrá. El tipo de MOE obtenido de los distintos PM_{10} presentaron características aceitosas, siendo más denso el extracto de PM_{10} proveniente de Facultad de Minas. Esta característica se atribuye principalmente a que el muestreador ubicado en ese sitio, está a una altura de 3 m y a 2m de distancia de una de las vía con mayor tráfico vehicular de la ciudad de Medellín, por lo que monitorea principalmente MP proveniente de emisiones de tráfico automotor, especialmente de camiones de motor diesel que transitan continuamente esta vía (20). A pesar de que en los otros dos sitios, Barbosa y Corantioquia, los muestreadores están ubicados en calles con alto tráfico vehicular, la altura de estos es de 7 y 12 m, respectivamente, por lo tanto no solo están dando cuenta de tráfico automotor sino de MP generados de otras emisiones, así el tipo de material orgánico adherido a estas partículas es de composición diferente al encontrado en la Facultad de Minas. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Wendy *et. al* (21) quienes encontraron que la cantidad de lípidos asociada a las partículas varía dependiendo de la fuente y tamaño de estas últimas, y además que la fracción lípidica modula la potencial toxicidad que presenta la partícula.

Se esperaba que en la zona semiurbana (Barbosa), con bajos niveles de PM_{10} , la genotoxicidad fuera mínima, sin embargo se observó que triplicaba la acción del filtro control. Esto se relaciona con lo reportado por Pope *et al.* (22), quienes demostraron que los efectos adversos producidos por la acción del MP se da a

diferentes niveles o cantidades de partículas y que estos son frecuentes en ambientes urbanos. El efecto genotóxico observado podría estar relacionado con los compuestos orgánicos que se adhieren a las partículas de 10 μm , muchos de ellos catalogados por entes de regulación internacional como mutagénicos, genotóxicos y/o carcinógenos, como algunos Hidrocarburos policíclicos aromáticos (23). Aproximadamente el 70- 90% de los HPA que se encuentran en el aire están unidos a MP, especialmente los de peso molecular alto, como Benzo (a) Pireno, Benzo (k) fluorantreno y los de peso molecular medio del tipo Benzo (a) antraceno y pireno (24). Estos HPA pueden unirse directamente a las partículas, PM_{10} o menores, liberadas en el proceso de combustión principalmente motores diesel (25) y su efecto genotóxico está mediado por enzimas microsomales, especialmente Cyp 1A1(24-27), es por esto que, aunque los linfocitos tratados no expresan una amplia gama de enzimas de metabolización de xenobióticos, tienen la capacidad de metabolizar HPA que requieren Cyp1A1, además, el efecto observado también puede ser atribuido a los HPA modificados que ejercen su acción genotóxica de manera directa (26-27).

Al evaluar la incidencia de la época climática sobre la genotoxicidad del PM_{10} , se obtuvo una mayor respuesta de daño en la época de transición, considerada en este estudio como la terminación del periodo de lluvias y el comienzo del periodo seco. Este resultado puede ser debido a que un aumento en la humedad relativa (HR) del aire lleva a un incremento en la capacidad de absorción de las partículas, las cuales pueden actuar como un núcleo de condensación (24). Muchos compuestos mutacarcinogénicos son liberados directamente al ambiente, otros se generan a partir de compuesto primarios por reacciones químicas, biológicas y

fotoquímicas en ese ambiente (28) como nitro, hidroxilo y oxo HPA que resultan de fotorreacciones con NO_x, ozono y OH (27-29). El porcentaje de humedad relativa reportado para la época seca, Julio de 2011 y enero de 2012, fue de 62 y 67%, mientras que para los dos meses de lluvia, Octubre de 2011 y Abril de 2012 el %HR fue del 70% y el %HR más alto se reportó para la época de transición, correspondiente a Diciembre de 2011, con el 80%.

En conclusión, los resultados indican el potencial riesgo para la salud de la población expuesta a PM₁₀ en las zonas urbanas y con alto tráfico. El enfoque de este estudio estuvo basado en PM₁₀, las partículas más finas, PM_{2.5}, tienen mayor facilidad de entrar a los alvéolos pulmonares y por ello deberían ser también evaluadas ya que solo con PM₁₀ se podría sobreestimar el riesgo. Identificar y estimar la exposición humana a estos compuestos mutacarcinógenos es imperativo para el análisis de riesgo de la salud pública. Se sugiere que adicionalmente al monitoreo químico convencional, se mida el efecto biológico (ejemplo, ensayos de genotoxicidad) que podría mejorar considerablemente este análisis de riesgo dada la complejidad de la mezcla de contaminantes. Estos resultados alertan sobre la necesidad de una continua revisión y ajuste de niveles de referencia como medida de control y protección de la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surfase waters: a review. *Mutation Research*. 2004. 567: 109 – 149
2. Den Besten P. Concepts for the implementation of biomarkers in Environmental monitoring. *Marine Environmental Research*. 1998. 46 (5): 253 – 256
3. USEPA, Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002 (EPA/600/8-90/057F).
4. OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test 207: earthworm, acute toxicity tests. In: Organization for Economic Co-operation and Development (ed.), OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 1984.
5. Park Sy, Choi J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environmental International*. 2007. 33: 817 – 822
6. Tancell, P. J.; Rhead, M. M.; Pemberton, R. P. Y Braven, J. Survival of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons During Diesel Combustion, *Environmental Science Technoogy*.1995. 29: 2871-2876
7. Solarte, I., Caicedo, M., Restrepo, S. Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria en niños menores de 14 años en Santa fede Bogotá. *Universidad Javeriana*. 1999.

8. Díaz Suárez Valeria & Páez Pérez Carlos. Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras. 2006. *ACTA NOVA*. 3 (2):308-322
9. Zuluaga Q. Mónica, Valencia R. Ana maria, Ortiz T. Isabel. Efecto mutagénico y genotóxico de contaminantes atmosféricos. *Redalyc: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Medicina UPB*. 2009. 28(1): 32-41
10. Toro G., M.V., Molina V., E., Serna P., J. Evaluación de los niveles de contaminación atmosférica en las zonas urbanas del Valle de Aburrá. Area metropolitana y Universidad Pontificia Bolivariana. 2010.
11. Hermelin Michel. Valle de Aburrá ¿Quo Vadis?. *Gestión y Ambiente*, 2007. 10 (2):1-10
12. Sato, m.i.z.; Valent, g.u.; Coimbra, c.a.; Coelho, m.c.; Sanchez Sanchez, p.; Alonso, c.d.; Martins, m.t.. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutation Research*. 1995 335 (3): 317-330
13. Noble P. B and Cuttis J. H. Separation of blood leukocytes by ficoll gradient. *Can. Vet. Journal*. 1967. 8: 110-111
14. Platel A, Gervais V, Sajot N, Nessler F, Marzin D, Claude N. Study of gene expression profiles in TK6 human cells exposed to DNA-oxidizing agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2010. 689(1-2):21-49.

15. Singh, NP, M McCoy, R Tice, and E Edward. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988. 175:184-19
16. McNamee, J.P., J.R. McLean, C.L. Ferrarotto, P.V. Bellier. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research*, 2000. 466:63-69
17. Ferreiro G, Cancino Badías L, Lopeznigro M, Palermo A, Mudry M, Prieto Gonzalez E, Carballo A. DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicology Letters*. 2002, 132: 109-115.
18. Seitz, N., Böttcher, M., Keiter, S., Kosmehl, T., Manz, W., Hollert, H., and Braunbeck, T. A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008. 652, 38-45.
19. REDAIRE, AREA METROPOLITANA. Evaluar y monitorear la calidad del aire en el Valle de Aburrá. 2012
20. AREA METROPOLITANA. Características de los sitios de monitoreo PM₁₀. 2008
21. Wendy Hsiao W.L., Zi-Yao Moa, Ming Fang b, Xin-mei Shi b, Fu Wangb. Cytotoxicity of PM_{2.5} and PM_{2.5-10} ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutation Research*. 2000. 471: 45-55

22. Pope CA, Burnet RT, Thun MJ, Calle EE, Kewski D, Ito K, Thurstan GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long - term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of the American Medical Association*, 2002. 287: 1132 - 1141.
23. Yvonne C. M. Staal¹, Daphnee S. Pushparajah², Marcel H. M. van Herwijnen, Ralph W. H. Gottschalk, Lou M. Maas, Costas Ioannides², Frederik J. van Schooten and Joost H. M. van Delft. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures: Effects on gene expression and DNA adduct formation in precision-cut rat liver slices. *Mutagenesis*. 2008. 23: 491-499.
24. Legator MS, Au WW. Application of integrated mutagenic monitoring: the optimal approach for detecting environmental carcinogens. *Environ Health Perspect* 1994;102:125–32.
25. Rosenkranz HS. Direct-acting mutagens in diesel exhausts: magnitude of the problem. *Mutat Res* 1982;101:1–10.
26. Mersch-Sundermann V, Kern S, Wintermann F. Genotoxicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and related structures on *Escherichia coli* PQ 37 (SOS Chromotest). *Environ Mol Mutagen* 1991;18:41–50.
27. M. Škarek, J. Janošek, P. Čupr, J. Kohoutek, A. Novotná Rychetská, I. Holoubek. Evaluation of genotoxic and non-genotoxic effects of organic air pollution using in vitro bioassays. *Environment International* 33 (2007) 859–866.
28. Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons and particles. *Science* 1997;276: 1045–52.

29. Finlayson-Pitts BJ, Pitts Jr JN. Chemistry of the upper and lower atmosphere.
San Diego, CA: Academic Press; 2000.

Contaminación por material particulado ($PM_{2.5}$ y PM_{10}) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín (2008-2009)

Particulate air pollution ($PM_{2.5}$ and PM_{10}) and medical consultations due to respiratory disease in Medellín (2008-2009)

Carlos F. Gaviria G¹; Paula C. Benavides C²; Carolina A. Tangarife³.

¹ Profesor e investigador del departamento de economía, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Correo electrónico: cfgaviria@udea.edu.co.

² Abogada, Secretaría de tránsito y Transporte, Medellín, Colombia. Correo electrónico: carolina.benavides@medellin.gov.co.

³ Economista, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Correo electrónico: caroarroyave@gmail.com.

Recibido: 18 de mayo de 2011. Aprobado: 10 de julio de 2011.

Gaviria CF, Benavides PC, Tangarife CA. Contaminación por material particulado ($PM_{2.5}$ y PM_{10}) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín (2008-2009). Rev. Fac. Nac. Salud Pública 2011; 29(3): 241-250

Resumen

La evidencia científica muestra cómo la contaminación del aire genera efectos negativos en la salud humana. En Medellín, Colombia, se registra un alto nivel de contaminación del aire por material particulado (medido por Redaire) y un considerable volumen de consultas externas y por urgencias a causa de enfermedades respiratorias, medidas por Metrosalud. **Objetivo:** presentar evidencia estadística de la relación positiva entre contaminación por material particulado $PM_{2.5}$ y PM_{10} y las consultas externas y por urgencia debidas a enfermedades respiratorias (asma, bronquitis, infecciones, rinitis). **Metodología:** se emplearon

modelos de series de tiempo sobrerregistros diarios de medición para PM_{10} y $PM_{2.5}$; se estimaron diez modelos por mínimos cuadrados ordinarios con corrección de White para ajustar problemas de heterocedasticidad; cinco modelos con consultas por enfermedades respiratorias y PM_{10} ; y cinco modelos con consultas por enfermedades respiratorias y $PM_{2.5}$. **Resultados:** se concluye que la contaminación del aire por material particulado provoca problemas respiratorios y, en consecuencia, es un problema de salud pública en Medellín. ----- **Palabras clave:** contaminación del aire (Q53), consultas hospitalarias por enfermedades respiratorias (I10)

Abstract

Scientific evidence shows how air pollution has negative effects on human health. Medellin city (Colombia) has high levels of air pollution (according to Redaire's measurements) as well as a high rate of medical and emergency consultations due to respiratory disease (according to Metrosalud's measurements). **Objective:** to show statistical evidence of the positive relationship between pollution due to $PM_{2.5}$ and PM_{10} particulate matter and the medical and emergency consultations due to respiratory diseases (asthma, bronchitis, infections, and rhinitis). **Methodology:** a number of time series models were applied on daily records of PM_{10} and $PM_{2.5}$ particles. A total of

ten models were calculated using ordinary least squares (OLS) with White's correction in order to adjust heteroskedasticity problems. Initially, five models were used for the consultations caused by respiratory disease and PM_{10} particles. Then, five additional models were used for the consultations caused by respiratory diseases and $PM_{2.5}$ particles. **Results:** particulate air pollution leads to respiratory disease, thus becoming a public health problem in Medellín, Colombia.

----- **Key words:** air pollution (Q53), hospital consultations due to respiratory disease (I10)

Introducción

La contaminación del aire es un problema que afrontan muchas ciudades del mundo. Se caracteriza como la conglomeración de distintas sustancias presentes en la atmósfera [1] emitidos en mayor medida por industrias y vehículos automotores. La preocupación sobre los efectos que la contaminación del aire tiene sobre la salud no es un tema nuevo; por el contrario, se ha debatido durante varias décadas. En la segunda mitad del siglo XX, diversos estudios encontraron que altos niveles de contaminación del aire, como consecuencia de grandes emisiones de gases relacionados con el consumo de combustibles fósiles, causan problemas de salud pública asociados a enfermedades respiratorias [2].

En Colombia, este problema es resultado de procesos urbanísticos y de la combustión de combustibles fósiles de mala calidad. Con el empleo de modelos de series de tiempo, el presente artículo busca relacionar la contaminación por material particulado (PM_{10} y $PM_{2,5}$) y las consultas externas y por urgencias generadas por enfermedades respiratorias en Medellín en el 2008 y el 2009. En la primera parte del artículo se caracteriza la contaminación en Medellín por material particulado (PM_{10} y $PM_{2,5}$). La segunda parte presenta la evidencia empírica sobre la incidencia de la contaminación del aire en la salud humana y las consultas por enfermedades respiratorias. En la última parte se presentan los modelos empleados y los resultados obtenidos. Finalmente, se exponen las conclusiones y la discusión.

Contaminación del aire

En la década de los sesenta del pasado siglo se realizaron reportes sobre la contaminación del aire y su relación con las tasas de mortalidad y morbilidad [3-5]. Otras investigaciones analizaron la relación de la morbilidad con la contaminación del aire usando modelos dosis-respuesta o modelos econométricos [6-8]. Estos trabajos emplearon series de tiempo para un área específica o datos de panel para múltiples ciudades [9, 10]. También se ha analizado la relación entre contaminación y admisiones hospitalarias y, en general, se relaciona la contaminación del aire con un mayor número de episodios de asma [11-14]. Varios estudios establecieron una correspondencia entre enfermedades respiratorias y material particulado y/o contaminación por dióxido de azufre [10,15].

En Medellín, la contaminación es un problema reciente vinculado al desarrollo urbanístico, en especial al crecimiento del parque automotor y al consumo de combustibles fósiles de baja calidad, como el diesel. Los

contaminantes críticos en Medellín son el material particulado y el ozono porque exceden la norma nacional y por su incidencia en el índice de calidad del aire [16]. En el presente estudio se analizó el material particulado (PM_{10} y $PM_{2,5}$).

El material particulado es un contaminante primario generado por la combustión ineficiente de combustibles fósiles; para el caso del menor de 10 micrómetros (PM_{10}), el mayor precursor es la combustión de diesel. En espacios interiores tiene efectos para la salud al depositarse irreversiblemente en el tracto respiratorio [17]. Los niveles de contaminación determinados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de riesgo para la salud humana son $20\mu\text{g}/\text{m}^3$ (media anual) y $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ (media diaria) [18]. El $PM_{2,5}$ (partículas menores a 2,5 micrones) consiste en varios compuestos comúnmente asociados con partículas ácidas, por la combustión de combustibles fósiles, producción manufacturera y quema agrícola [9]. La OMS determinó sus concentraciones como de riesgo para la salud humana, así: $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ (media anual) y $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ (media diaria). La concentración de la contaminación puede afectarse por cambios en el clima (humedad, precipitaciones, vientos, etc.); además, es difícil controlar simultáneamente los múltiples contaminantes y separar e identificar los efectos de cada uno de ellos, debido a que muchos contaminantes se generan a través de la misma fuente y, por lo tanto, están correlacionados [19].

Actualmente, en la ciudad se mide de forma continua la contaminación, incluyendo material particulado. La naturaleza y magnitud de dicho material se monitorea como sólidos suspendidos totales (total de partículas). El PM_{10} y el $PM_{2,5}$ se miden recientemente en Medellín mediante seis estaciones manuales y tres medidores automáticos. En el caso del $PM_{2,5}$, se han ubicado tres estaciones de medición.

Material particulado menor de 10 micrones (PM_{10})

Muñoz y otros encontraron entre el 2000 y el 2005 concentraciones de PM_{10} en promedio de $63\mu\text{g}/\text{m}^3$. Este valor está dentro de la norma establecida por la Resolución 601 del 2006 (límite mensual de $70\mu\text{g}/\text{m}^3$). Sin embargo, está por encima de la norma internacional de la OMS que lo establece como de riesgo para la salud humana ($50\mu\text{g}/\text{m}^3$) [20]. De otra parte, Uribe reportó que en el 2002 y el 2003 las concentraciones de sólidos suspendidos totales excedían la norma de $100\mu\text{g}/\text{m}^3$, y para PM_{10} , el promedio de las concentraciones se encontraba cerca del tope establecido por la norma [21].

En el 2008, el Área Metropolitana del Valle de Aburrá (AMVA) reportó que las concentraciones anuales de PM_{10} en Medellín no excedieron la norma nacional (70

$\mu\text{g}/\text{m}^3$), excepto la estación manual de la Universidad Nacional ($83 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Sin embargo, todas las estaciones de Medellín excedieron tres o cuatro veces la norma de la OMS. En cuanto a las concentraciones diarias, los valores máximos se presentaron en la Universidad Nacional ($158 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y en San Antonio ($130 \mu\text{g}/\text{m}^3$): ambos están por encima de la norma de la OMS [22]. En el 2009, los promedios anuales de PM_{10} mostraron una disminución de entre 5 y 15% en todas las estaciones. Esto se debe a: 1) la mejora en la calidad del diesel distribuido en Medellín; y 2) el cambio de la norma anual nacional para el PM_{10} , que pasó a $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Bajo esta normativa, cinco estaciones en Medellín excedieron el promedio anual y, sin excepción, todas excedieron la norma de la OMS [22]. Así, las estaciones más contaminadas anualmente están ubicadas en el centro de la ciudad (Edificio Miguel de Aguinaga y el parque de San Antonio), debido a la influencia de fuentes móviles [22].

Material particulado menor de 2,5 micrones ($PM_{2,5}$)

El informe del AMV del 2008 establece que los promedios anuales en las estaciones de Medellín superaron la norma anual de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, definida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la norma anual de la OMS ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [22].

En conclusión, las emisiones de material particulado PM_{10} en Medellín, aunque están dentro de los promedios establecidos por la norma nacional, no cumplen con el promedio establecido por la OMS para emisiones sin riesgo para la salud humana. Para el $PM_{2,5}$, las concentraciones son preocupantes por su gran influencia en la salud, en especial, en el centro de Medellín, zona crítica con alta movilidad vehicular y de personas. La alcaldía de Medellín estima que aproximadamente un millón de personas transitan por el centro de Medellín de forma intermitente, además de los más de 9.000 venteros ambulantes registrados por la oficina de espacio público — que permanecen entre seis y diez horas expuestos a material particulado (PM_{10} y $PM_{2,5}$)—. No obstante, Muñoz y otros reconocen que a pesar de la información sobre material particulado existente en Medellín desde 1971, no se tiene información cuantificada de la magnitud de los efectos sobre la salud humana [20].

Problemas en la salud asociada a material particulado

La OMS ha establecido la relación entre material particulado y la salud pública [18]. Los efectos en la salud son amplios, relacionados en algunos casos con síntomas en las vías respiratorias superiores, como reacciones alérgicas, congestión nasal, sinusitis, tos, fiebre del heno, irritación en los ojos, entre otros. En otros casos,

se relacionan con síntomas en las vías respiratorias inferiores, que requieren un tratamiento especial, como bronquitis, asma, enfisema, entre otros [9,10, 23]. También se presentan problemas severos, como cáncer de pulmón y anomalías reproductivas [24].

Una amplia evidencia muestra cómo el riesgo de problemas respiratorios o cardiovasculares aumenta con la exposición, y algunos estudios revelan un valor mínimo por debajo del cual no existan efectos adversos en la salud [2, 11, 18, 25-31]. Se ha estimado que en los Estados Unidos y en Europa occidental hay exposiciones de entre 3 y $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($PM_{2,5}$) que provocan problemas en la salud [18]. En general, se debate el nivel de exposición, así como la fuente contaminante: mientras que algunos académicos sugieren que altos niveles de material particulado o gases inciden en la salud [23, 33], otros afirman que los efectos en la salud se presentan aun con bajas concentraciones [34, 14]. En general, la medición del grado de concentración y de los efectos en la salud es un asunto complejo [8].

En algunos estudios, se estima que la incidencia está correlacionada con las estaciones climáticas y con variables como temperatura, precipitación, humedad o punto de rocío [13, 32]. Otros observan que el efecto y la magnitud de la enfermedad varían con los individuos, las condiciones socioeconómicas y el grado de exposición [1]. Algunos investigadores establecen que el estatus socioeconómico desempeña un papel importante en la salud [19, 31,35-37]. Neidelly el informe “Medellín como vamos” afirman que la contaminación en la zona afecta de manera especial a los niños, haciéndolos más propensos a enfermedades como el asma [19, 38]. O’Neill y otros afirman que las personas de menores recursos socioeconómicos son más vulnerables a la contaminación del aire por su relativa desventaja y estrés psicosocial, además del reducido acceso a los tratamientos médicos [24]. La magnitud de los efectos puede ser fácilmente cubierta por otros eventos que no estén relacionados con la contaminación del aire, incluso cuando se controla el efecto de la contaminación por fuentes móviles [39].

Consultas por enfermedades respiratorias en Medellín: la evidencia

Los datos sobre consultas por problemas respiratorios en Medellín entre el 2007 y el 2009 muestran una mayor cantidad de consultas por bronquitis e infecciones respiratorias en el 2008, especialmente entre los meses de abril y julio. Asimismo, las consultas por bronquitis fueron mayores en el 2007 que en el 2009, mientras que por infecciones, las consultas fueron mayores en el 2009 que en 2007.

Aunque los promedios mensuales de bronquitis son mayores en el 2008, el mayor promedio se presenta en mayo del 2007. Análogamente, se produce una reducción de los promedios en el 2009. En cuanto a infecciones, los mayores promedios están en el 2008 y el mayor valor promedio mensual, en junio del mismo año. En el 2009, los promedios son menores respecto del 2008 y mayores a los reportados en el 2007. La tendencia de las consultas por problemas respiratorios muestra que el mayor número de casos se presentó en el 2008 (78.958), mientras que en el 2007 y el 2009 se reportaron cifras similares (70.271 y 70.044, respectivamente).

La contaminación del aire y los efectos en la salud: evidencia empírica

Dado el nivel de contaminación en la ciudad y la evidencia empírica que relaciona contaminación del aire con problemas respiratorios, se puede esperar una relación positiva entre las consultas por problemas respiratorios y el nivel de contaminación en Medellín (especialmente por PM_{10} y $PM_{2.5}$). Esta relación se observa cuando el comportamiento de los promedios diarios PM_{10} y $PM_{2.5}$ y las consultas es similar para ambas variables en una relación directamente proporcional.

Gómez y otros analizaron la contaminación por PM_{10} en la zona de Guayabal, que revela altos índices de contaminación y los posibles problemas en la salud, pero no elaboran una correlación entre ambas variables [40]. Lenis y Ospina buscaron una relación cualitativa entre material particulado y enfermedades respiratorias [41]. Muñoz y otros, empleando espirometría y mediciones antropométricas en adultos en diferentes niveles de exposición para varios municipios del Valle de Aburrá, hallaron que no hay diferencia, en términos de salud, entre los individuos expuestos y los no expuestos [20]. El informe “Medellín como vamos” presentó un estudio acerca del riesgo que tienen estudiantes de preescolar desufrir problemas respiratorios después de una exposición prolongada a ciertos contaminantes [38]. Martínez comparó el aire de Medellín con el de una población del oriente cercano, y observó la relación con problemas respiratorios. A pesar de lo que indican estos estudios, no se corrobora con modelos econométricos que la contaminación por material particulado tenga incidencia en la salud humana. El siguiente apartado emplea modelos econométricos para validar la incidencia que la contaminación por material particulado tiene sobre la salud humana (medido por consultas externas y por urgencias a causa de enfermedades respiratorias) [42].

Metodología

Para medir la relación entre consultas por problemas respiratorios y contaminación por material particulado, se emplean registros diarios para PM_{10} y $PM_{2.5}$ de marzo del 2008 a diciembre del 2009, datos suministrados por Redaire. Los promedios de PM_{10} se tomaron de las estaciones de medición automática para Medellín ubicadas en el parque de San Antonio, el Politécnico Jaime Isaza Cadavid y la Universidad Nacional (Facultad de Minas). Para el $PM_{2.5}$, el promedio se obtuvo de las estaciones automáticas del edificio Miguel de Aguinaga y de El Poblado. Los datos sobre las consultas externas y por urgencias diarias por problemas respiratorios en Medellín fueron suministrados por Metrosalud. Las enfermedades tomadas son las que corresponden a los grupos de asma, bronquitis, infecciones, rinitis y total de enfermedades.

Para este análisis se emplearon modelos de series de tiempo. Se estimaron diez modelos por mínimos cuadrados ordinarios con corrección de White para ajustar problemas de heterocedasticidad (causada posiblemente por la amplitud de las variables respecto a su media o por la omisión de variables), con lo cual los coeficientes se pueden emplear para hacer inferencia estadística: cinco modelos con consultas por enfermedades respiratorias y PM_{10} y cinco modelos con consultas por enfermedades respiratorias y $PM_{2.5}$. Para la estimación de los modelos se empleó el paquete estadístico E-views 7.

Los modelos buscan validar la relación positiva entre contaminación por material particulado (PM_{10} y $PM_{2.5}$) y cada uno de los grupos de enfermedades. Con el fin de suavizar la amplitud de la varianza para las series de tiempo y para facilitar el análisis, las variables se transformaron en logaritmos (con lo cual el modelo estimado es log-log). La representación del modelo es la siguiente:

$$\ln y_t = c + \beta_1 \ln x_t + \beta_2 \ln Prep_t (-7) - \beta_3 dsab_t - \beta_4 ddom_t + AR(6) + \mu_t$$

donde se refiere al logaritmo de las consultas por enfermedades (por grupo asma, bronquitis, infecciones, rinitis y total enfermedades); $\ln x_t$ es el logaritmo de la contaminación (expresada en el modelo como $\ln PM_{10}$ o $\ln PM_{2.5}$). De las variables climáticas posibles para emplear (*humedad* y *precipitación*), se eligió, empleando test de correlación de Spearman, la *precipitación*, que evidenció un mejor ajuste con la variable consultas; además, las variables *humedad* y *precipitación* presentaban una alta correlación entre ellas. Así, $\ln PREP_t (-7)$ es el lo-

garitmo de la precipitación que recoge efectos relacionados con el clima, como sugieren diferentes trabajos (esta se representa en los resultados como LNPREP(-7)). Asimismo, DSAB* y DDOM† son variables *dummy*‡ para sábado y domingo que recogen efectos de fin de semana (menor promedio de consultas hospitalarias). Se incluyó un modelo autorregresivo de orden seis (AR(6)), debido a la dependencia de *lny*, de sus valores anteriores; esto implica una relación marcada de la variable dependiente con sus valores, hasta seis días atrás. La inclusión de variables *dummy* y del vector AR mejora el modelo, aumentando la robustez de los residuales§ y eliminando problemas de correlación serial. Para la selección de las variables se emplearon pruebas de correlación de Spearman, lo que determinó la independencia de las variables del modelo. Adicionalmente, se estableció el empleo del mecanismo de introducción progresiva (*forward step wise regression*), teniendo como criterio el estadístico *t*. Como resultado, el modelo deben incluir como variable regresorasolo una variable de contaminación (PM₁₀ o PM_{2,5}) y solo una variable climática (precipitación).

Se espera que la contaminación por PM₁₀ y PM_{2,5} sea significativa y positiva. Dada la naturaleza de la contaminación (fuentes móviles) y los datos de consultas de las Unidades Prestadoras de Servicios de Salud (UPSS), se estima que las personas afectadas pertenecen al régimen subsidiado (estratos 1, 2 y 3) y que, por ende, son personas con mayor vulnerabilidad frente a problemas respiratorios relacionados con la contaminación [24].

Similarmente, se supone que el hecho de estar en el sistema subsidiado implica que posiblemente las fuentes de ingresos provengan de actividades económicas informales (vendedores ambulantes, actividades propias o de rebusque).

Resultados

En general, los modelos estimados establecen una relación positiva entre consultas hospitalarias para cada uno de los grupos (asma, bronquitis, infecciones, rinitis y total de enfermedades) y la contaminación por material particulado (PM₁₀ y PM_{2,5}). Desagregando los modelos para material particulado PM₁₀, las variables material particulado y precipitación explican positivamente las consultas por grupo de enfermedad. Según el R^{2**} ajustado, las variables regresoras explican las consultas por grupos en más de 60% de los casos. Los coeficientes hallados (tabla 1) se asumen como las elasticidades, es decir, que un aumento de 10% en la emisión de PM₁₀ genera un aumento de 6,2% en el total de admisiones hospitalarias. Por grupos, el mayor coeficiente se presenta para el grupo rinitis (1,45) y el menor, para el grupo asma (0,38). El efecto de la variable climática (precipitación) es positivo y significativo para el séptimo rezago; así, un aumento de 10% en la precipitación aumenta las consultas totales en la siguiente semana en 0,2%. El mayor efecto sucede sobre las consultas por rinitis (0,07) y el menor, sobre infecciones (0,022).

Tabla 1. Coeficientes de relación entre consultas por grupo de enfermedades y contaminación por material particulado (PM₁₀)

Variables independientes	PM ₁₀				
	Ama	Bronquitis	Infecciones	Rinitis	Total enfermedades
LNPM10	0,3822 (0,000)	0,6667 (0,000)	0,5376 (0,000)	1,4506 (0,000)	0,6170 (0,000)
LNPREP(-7)	0,0233 (0,002)	0,0279 (0,007)	0,0222 (0,009)	0,0669 (0,024)	0,0241 (0,002)
DSAB	-0,2782 (0,000)	-0,2783 (0,000)	-0,4872 (0,000)	-0,4529 (0,000)	-0,8752 (0,000)

* Variable de efecto fijo del sábado

† Variable de efecto fijo del domingo

‡ Son variables cualitativas, también conocidas como indicativas, binarias, categóricas y dicotómicas. Sólo pueden asumir los valores 0 y 1, indicando respectivamente ausencia o presencia de una cualidad o atributo.

§ La estimación del modelo sin variables *dummy* y sin el vector autorregresivo mostraba tendencia sinusoidal para los días del fin de semana; su inclusión eliminó dicho efecto y suavizó los residuales.

** Indica la proporción de variación en la variable dependiente o criterio explicada por las variables predictoras o independientes.

Continuación tabla 1

Variables independientes	PM ₁₀				
	Ama	Bronquitis	Infecciones	Rinitis	Total enfermedades
DDOM	-0,5407 (0,000)	-0,8204 (0,000)	-0,9402 (0,000)	-2,5373 (0,000)	-0,4053 (0,000)
C	2,4134 (0,000)	0,9429 (0,043)	2,4357 (0,000)	-2,6426 (0,034)	2,9085 (0,000)
AR(1)	0,3570 (0,000)	0,2412 (0,000)	0,1761 (0,000)	0,2282 (0,001)	0,2853 (0,000)
AR(2)	—	0,1027 (0,010)	—	—	—
AR(3)	—	—	—	—	0,0769 (0,024)
AR(4)	0,1584 (0,000)	—	0,0892 (0,009)	—	0,0853 (0,009)
AR(6)	0,1807 (0,000)	0,1552 (0,000)	0,1059 (0,017)	0,1412 (0,010)	0,1257 (0,003)
R ²	0,6354	0,6046	0,7143	0,7608	0,7565
R ² ajustado	0,6313	0,6002	0,7111	0,7562	0,7533
Durbin-Watson	2,0823	2,0645	2,0067	2,1542	2,0132

LNPM10: logaritmo PM₁₀

LNPREP(-7): logaritmo de precipitaciones rezagado

DSAB: variable de efecto fijo del sábado

DDOM: variable de efecto fijo del domingo

C: constante

AR(N): evidencia la relación de la variable dependiente, con sus valores pasados hasta el sexto día. En alguno de los modelos estimados, los AR(N) no fueron significativos y se omitieron

Fuente: Elaboración del autor

Las variables DSAB y DDOM presentan un efecto negativo y significativo, lo que implica que las consultas por enfermedades disminuyen y la emisión se reduce, pero no en similar proporción. Esta tendencia es uniforme en todos los modelos estimados. El proceso autorregresivo de orden seis (AR(6)) se acentúa para algunos días en particular, dependiendo del modelo estimado; esto implica que en algunos modelos las consultas dependen de las consultas de días anteriores hasta el sexto día. Además, para todos los modelos, el valor del coeficiente AR(5) fue no significativo. El primer dato de la serie de tiempo corresponde al día viernes (28-03-2008), lo cual implica que el viernes y el inicio del fin de semana tienen un efecto relevante en el modelo estimado.

Análogamente, en los modelos con material particulado PM_{2,5} (tabla 2), la contaminación por PM_{2,5} y la precipitación explican positivamente las consultas totales

hasta en 71% de los casos. El comportamiento resulta equivalente para los modelos por grupos de enfermedad, donde el menor valor se da para las consultas por bronquitis (0,57) y el mayor, para las consultas por rinitis (0,73). Los coeficientes muestran la sensibilidad (elasticidad) entre PM_{2,5} y las consultas, de forma tal que un aumento de 10% en la contaminación por PM_{2,5} aumenta las consultas totales por enfermedades respiratorias en 3,4%. Una tendencia similar sucede por grupo de enfermedades, donde el mayor coeficiente se presenta en las consultas por rinitis (0,98) y el menor, en las consultas por asma (0,22). Igualmente, las variables DSAB y DDOM evidencian un efecto negativo significativo para el fin de semana (igual que para modelos con PM₁₀). El total de consultas totales depende de sus valores anteriores hasta seis días atrás (AR(6)); en algunos modelos los coeficientes de los valores pasados (AR) fueron no significativos.

Tabla 2. Coeficientes de relación entre consultas por grupo de enfermedades y contaminación por material particulado ($PM_{2,5}$)

Variables independientes	$PM_{2,5}$				
	Asma	Bronquitis	Infecciones	Rinitis	Total enfermedades
LNPM2_5	0,2168 (0,000)	0,4560 (0,000)	0,2960 (0,000)	0,9798 (0,000)	0,3416 (0,000)
LNPREP(-7)	0,0237 (0,002)	0,0294 (0,006)	0,0251 (0,007)	0,0589 (0,003)	0,0252 (0,012)
DSAB	-0,2862 (0,000)	-0,3248 (0,000)	-0,5045 (0,000)	-0,5034 (0,000)	-0,3995 (0,000)
DDOM	-0,6101 (0,000)	-0,9900 (0,000)	-1,0492 (0,000)	-2,8685 (0,000)	-0,9716 (0,000)
c	3,2338 (0,000)	2,1270 (0,000)	3,6211 (0,000)	—	4,2565 (0,000)
AR(1)	0,3698 (0,000)	0,2404 (0,000)	0,1689 (0,000)	0,1746 (0,010)	0,2981 (0,000)
AR(2)	—	0,0970 (0,0177)	—	0,1067 (0,002)	—
AR(3)	0,1385 (0,000)	0,1011 (0,009)	—	—	—
AR(4)	0,2008 (0,000)	—	0,0754 (0,017)	—	0,0659 (0,050)
AR(5)	—	0,1660 (0,000)	—	—	—
AR(6)	—	—	0,1185 (0,007)	—	0,1670 (0,000)
R²	0,6048	0,5803	0,6802	0,7330	0,7140
R² ajustado	0,6004	0,5749	0,6766	0,7303	0,7108
Durbin-Watson	2,0951	2,0500	2,0094	2,1107	2,0407

LNPM2_5: logaritmo de $PM_{2,5}$

LNPREP(-7): logaritmo de precipitaciones rezagado

DSAB: variable efecto fijo sábado

DDOM: variable efecto fijo domingo

AR(N): evidencia la relación de la variable dependiente, con sus valores pasados hasta el sexto día. En alguno de los modelos estimados, los AR(N) no fueron significativos y se omitieron

Fuente: Elaboración del autor

Al comparar por grupos la contaminación por PM_{10} , esta tiene un efecto superior sobre cada uno de los grupos de enfermedades que la contaminación por $PM_{2,5}$. En particular, para los modelos con consultas por asma, bronquitis e infecciones, el efecto de LNPREP(-7), DSAB y DDOM es mayor con $PM_{2,5}$. En términos comparativos, las variables regre-

soras de los modelos con PM_{10} explican mejor la variable dependiente que con $PM_{2,5}$, aunque en la literatura, la OMS y otros investigadores reconocen que los efectos del material particulado menor de 2,5 tienen mayor incidencia en problemas respiratorios a causa del tipo de partícula, que resulta difícil de filtrar por medio de los bellos nasales.

Conclusiones

La evidencia empírica sobre la relación entre diferentes tipos de material particulado es abundante, sin embargo, este tipo de relaciones (econométricas) no se han elaborado para la ciudad de Medellín. Los modelos estimados por grupo de enfermedades y total de enfermedades confirman que existe una correlación positiva entre contaminación por material particulado (PM_{10} y $PM_{2,5}$) y consultas por enfermedades respiratorias. Los coeficientes en cada uno de los modelos estimados evidencian un efecto superior de PM_{10} que por contaminación por $PM_{2,5}$. En el caso de las variables climáticas, las cuales buscan incluir otros factores adicionales que pueden incidir en problemas respiratorios, la evidencia establece que sí tienen incidencia positiva, aunque menor que la del efecto que tiene la contaminación por material particulado. En especial, esta variable $LNPREP(-7)$ establece que un efecto de la precipitación se ve una semana después en las consultas por grupo de enfermedad.

La relevancia de las variables *dummy* de fin de semana en todos los modelos estimados muestra que especialmente los sábados y domingos exponen una tendencia inversa: un nivel promedio de contaminación con menores consultas. En general, en promedio, en el fin de semana hay una disminución de las emisiones de PM_{10} y $PM_{2,5}$, al igual de lo que sucede con el número de personas que consultan por problemas respiratorios. Dada la naturaleza de los datos (diarios), el tipo de contaminación empleada (material particulado por fuentes móviles) y los datos de salud obtenidos de entidades públicas que atienden en su mayoría a personas del nivel subsidiado, tiene sentido que una mayor exposición a la contaminación durante la semana implique mayores casos de enfermedades respiratorias, mientras que los fines de semana, cuando el promedio de contaminación se reduce, el número de consultas por enfermedades respiratorias también desciende.

Este primer acercamiento sirve como herramienta para elaborar otros estudios que midan los costos asociados al tratamiento de problemas respiratorios: en la medida en que la contaminación del aire provoque un efecto negativo en la salud humana, asimismo genera un problema de salud pública. Un tratamiento que puede sugerirse es el de valorar los efectos que esto produce en la formación de capital humano o la pérdida que genera a través de los días laborales perdidos. Adicionalmente, como lo sugieren diferentes investigadores, pueden abordarse no solo problemas respiratorios, sino cardiovasculares o, incluso, puede analizarse el efecto de la contaminación sobre las tasas de morbilidad y de mortalidad (por muertes no violentas) para determinar con

mayores elementos la relación existente entre contaminación y salud humana.

Discusión

Este tipo de análisis es pionero en la ciudad y refleja lo que otros estudios han encontrado con respecto a la relación entre la contaminación y sus efectos sobre la salud, con cuyos resultados coinciden [10, 27, 31, 37, 40-43]. Así, para cada uno de los modelos estimados en el presente estudio por grupos de enfermedades, las tendencias son similares, no solo en la significancia de las variables, sino en los signos que presentan. Este resultado refuerza la evidencia presentada para Medellín sobre la forma en que la contaminación del aire genera problemas respiratorios [20, 38, 40, 42].

Aunque los efectos de la contaminación del aire sobre la salud difieren en intensidad en los individuos, es evidente que dichos efectos existen. Mientras en algunos individuos pueden manifestarse algunos síntomas menores (como ojos llorosos, nariz acuosa o alergias), en otros individuos puede causar síntomas agudos (infecciones pulmonares, bronquitis u otras enfermedades). El grupo de enfermedades seleccionadas incluyó solo un grupo de enfermedades respiratorias; sin embargo, podrían incluirse otras enfermedades o síntomas de las vías respiratorias superiores y estimar las relaciones existentes entre la contaminación y dichos efectos. Lo que sí establecen diferentes estudios, que a su vez se plantea como futura investigación, es que los grupos con menor estatus socioeconómico son generalmente grupos vulnerables cuando se exponen a un grado de contaminación de manera continua. Por ejemplo, como ya se ha discutido en el presente estudio, dada la naturaleza de los datos de consultas por enfermedades respiratorias, se espera que estos individuos pertenezcan a estratos socioeconómicos bajos (1, 2 o 3) y que, por ende, estén dentro del grupo que se clasifica como vulnerable. Sin embargo, es necesario realizar estudios futuros para estimar dicha relación.

Similarmente, los resultados encontrados muestran que la incidencia de PM_{10} es superior a $PM_{2,5}$, aunque en estudios elaborados por la OMS se establece que este último tiende a tener un efecto superior en la salud humana. Esto implica que posiblemente deban medirse los efectos de largo plazo y no los de corto plazo. Cada organismo es diferente y la exposición a la contaminación no necesariamente se manifiesta de manera inmediata, sino en un periodo de tiempo (una o dos semanas después o cuando haya transcurrido un cierto grado de exposición diaria de manera continua).

Sin embargo, este primer acercamiento estadístico para Medellín muestra cómo el número de consultas

por enfermedades respiratorias están relacionadas con el grado de contaminación del aire en la ciudad. En este sentido, este estudio puede ayudar a establecer futuras investigaciones en problemas relacionados con salud pública. No es una novedad que existe un problema de contaminación del aire en la ciudad, causado en parte por la combustión excesiva de combustibles fósiles de mala calidad. Aunque los niveles de contaminación del aire han mejorado en los últimos años (con evidencia en la disminución en los promedios de emisiones por material particulado), sigue teniendo incidencia en la salud humana, dado que los estándares todavía se encuentran por debajo de los niveles internacionales establecidos por la OMS.

Por otra parte, no existen suficientes estudios que valoren el impacto sobre los sistemas de salud o que identifiquen relaciones entre este problema y la aplicación de medidas que busquen mitigar dichos efectos. El problema de la contaminación, dados sus efectos en la salud humana, se considera un problema de salud pública con consecuencias significativas sobre la tasa de morbilidad y mortalidad (por causas no violentas) en la ciudad. Así, este tipo de estudio puede replicarse para otros contaminantes relacionados con emisiones móviles y su incidencia en la salud humana, considerando que probablemente los efectos de la exposición no se manifiestan de forma inmediata; ello puede tardar varios días, según diferentes condiciones sociales o de características físicas de los individuos.

Una aproximación más acertada para medir diferentes efectos en la salud se ha presentado en varios estudios, que incluyen problemas cardio-respiratorios en las admisiones hospitalarias en especial para $PM_{2.5}$; según la OMS, este último genera mayor incidencia en tales casos. Aunque es difícil establecer la incidencia directa entre cuál de los contaminantes afecta en mayor medida la salud, es posible que en futuras investigaciones se elaboren modelos para múltiples contaminantes, no solo sobre las consultas por enfermedades respiratorias, sino sobre tasas de morbilidad o mortalidad (por causas no violentas).

Agradecimientos

Se agradece a Metrosalud, la Red de Vigilancia de la Calidad del Aire (Redaire) y al Centro de Investigaciones y Consultorías (CIC), de la Facultad de Ciencias Económicas por su apoyo en el desarrollo del presente artículo. A Sergio Restrepo e Isabel Cristina Garcés por sus comentarios y apreciaciones. A Sweet, por su comprensión.

Referencias

- 1 Chappie M, Lave L. The Health Effects of Air Pollution: A Reanalysis. *Journal of Urban Economics* 1981; 12: 346-376.
- 2 Atkinson RW, Bremner, SA, Anderson HR, Strachan DP, Bland JM., de Leon A. Short-term Associations between Emergency Hospital Admissions for Respiratory and Cardiovascular Disease and Outdoor Air Pollution in London. *Archives of Environmental Health* 1999; 54: 398-411.
- 3 Glasser M, Greenburg L, Field F. Mortality and Morbidity During a Period of High Levels of Air Pollution. *Archives of Environmental Health* 1966; 15: 684-694.
- 4 McCarroll J. Measurements of Morbidity and Mortality Related to Air Pollution. *Journal of Air Pollution and Control Association* 1967; 17: 203-209.
- 5 Dean G. Air Pollution and Health. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health* 1968;88: 31-32.
- 6 Waddell T. The Economic Damages of Air Pollution. *Economic Analysis Branch*. Washington Environmental Research Center: Washington D.C; 1974.
- 7 Page WP, Fellner W. Exploratory Techniques for the Determination of Potential Dose-Response Relationships between Human Health and Air Pollution. *Journal of Environmental Economics and Management* 1978; 5: 376-389.
- 8 Mendelsohn R, Orcutt G. An Empirical Analysis of Air Pollution Dose-Response Curve. *Journal of Environmental Economics and Management* 1979; 6: 85-106.
- 9 Dockery DW, Pope AC. Acute Respiratory Effects of Particulate Air Pollution. *Annual Review of Public Health* 1994; 15: 107-132.
- 10 Pope AC, Bates DV, Raizenne ME. Health Effects of Particulate Air Pollution: Time for Reassessment?. *Environmental Health Perspectives* [revista en internet] 1995. [acceso 10 de Junio de 2010]; 1: 472-480. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1523269/pdf/envhper00354-0064.pdf>.
- 11 Bates D, Sitzo R. Air Pollution and Hospital Admissions in Southern Ontario: The Acid Summer Haze Effect. *Environmental Research* 1987; 43: 317-331.
- 12 Bates D; Baker AM, Sitzo R. Asthma Attack Periodicity: A Study of Hospital Emergency Visits in Vancouver. *Environmental Research* 1990; 51: 51-70.
- 13 Schwartz J, Spix C, Wichmann HE, Malin E. Air Pollution and Acute Respiratory Illness in Five German Communities. *Environmental Research* 1991; 56: 1-14.
- 14 Lipfert, FW, Hammerstrom T. Temporal Patterns in Air Pollution and Hospital Admissions. *Environmental Research* 1992; 59: 374-399.
- 15 Zuidema, T, Nentjes A. Health Damage of Air Pollution: An Estimate of a Dose-Response Relationship for the Netherlands. *Environmental and Resource Economics* 1997; 9: 291-308.
- 16 Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Evaluación de los niveles de contaminación en las zonas del valle de Aburrá: calidad del aire en el Valle de Aburrá en el 2008 [internet]. Medellín, Universidad Nacional; 2009. [acceso 15 de Febrero de 2010]. Disponible en: <http://www.metropol.gov.co/aire/compartidos/>.
- 17 Adonis M, Cáceres D, Moreno G, Gil L. Contaminación del aire en espacios interiores. *Ambiente y Desarrollo* 1995; 11: 79-89.
- 18 Organización Mundial de la Salud. Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. OMS; 2008

- 19 Matthew N. Air Pollution, Health, and Socio-Economic Status: The Effect of Outdoor Air Quality on Childhood Asthma. *Journal of Health Economics* 2004; 23(6): 1209-1236.
- 20 Muñoz AM, Paz JJ, Quiroz CM. Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud en adultos que laboran a diferentes niveles de exposición. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 2007; 25(2): 85-94.
- 21 Uribe E. Air Pollution Management in Two Colombian Cities: Case Study. *Revista Desarrollo y Sociedad* 2004; 54: 1-50.
- 22 Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Calidad del aire en el valle de Aburrá en el 2009. Universidad Nacional de Colombia: Medellín; 2009.
- 23 Shy CM. Epidemiologic evidence and the United States air quality standards. *American Journal of Epidemiology* 1979; 110: 661-671.
- 24 O'Neill MS, Jerrett M, Kawachi I, Levy JJ, Cohen AJ, Gouveia N, Wilkinson P, Fletcher T, Cifuentes L, Schwartz J. Health, Wealth, and Air Pollution: Advancing Theory and Methods. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111: 1861-1870.
- 25 Burnett R, Doiron MS, Stieb D, Sabit M, Brook JR. Effects of Particulate and Gaseous Air Pollution on Cardiorespiratory Hospitalizations. *Archives of Environmental Health* 1999; 54(2): 130-139.
- 26 Linn W, Szlachcic Y, Gong H, Kinney P, Berhan K. Air Pollution and Daily Hospital Admissions in Metropolitan Los Angeles. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108 (5): 427-434.
- 27 Zanobetti A, Schwartz J. Air Pollution and Emergency Admissions in Boston, MA. *Journal of Epidemiology Community Health* 2006; 60: 890-895.
- 28 Bell M, Ebisu K, Peng RD, Walker J, Samet JM, Zeger S, Dominici F. Seasonal and Regional Short-term Effects of Fine Particles on Hospital Admissions in 202 US Counties, 1999-2005. *American Journal of Epidemiology* 2008; 168 (11): 1301-1310.
- 29 Bell M, Ebisu K, Peng RD, Samet JM, Dominici F. Hospital Admissions and Chemical Composition of Fine Particle Air Pollution. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009; 179: 1115-1120.
- 30 Campos J, Palomo I. Polución aérea y estado protrombótico. *Anuario Facultad de Medicina [revista en internet]* 2009. [acceso 12 de Abril de 2010]; 70(1): 41-44. Disponible en: [www.http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832009000100007&lng=es&nrm=iso](http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832009000100007&lng=es&nrm=iso). ISSN 1025-5583.
- 31 Zanobetti A, Meredith F, Koutrakis P, Schwartz J. Fine Particulate Air Pollution and Its Components in Association with Cause-Specific Emergency Admissions. *Environmental Health* 2009;8(1): 58-70.
- 32 Atkinson RW, Ross A, Sunyer J, Ayres J, Baccini M, Vonk JM, Boumghar A, Forastiere F, Forsberg B, Touloumi G, Schwartz J, Katsouyanni K. Acute Effects of Particulate Air Pollution on Respiratory Admissions: Results from APHEA-2 Project. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001; 164: 1860-1866.
- 33 Bates D. The Health Effects of Air Pollution. *Journal of Respiratory Diseases* 1980; 1: 29-37.
- 34 Korn EL, Whittemore AS. Methods of Analyzing Panel Studies of Acute Health Effects of Air Pollution. *Biometrics* 1979; 35: 745-802.
- 35 Fauroux B, Sampil M, Quenel P, Lemoullec Y. Ozone: A Trigger for Hospital Pediatric Asthma Emergency Room Visits. *Pediatric Pulmonology* 2000; 30: 41-46.
- 36 Leavy D, Lumley T, Sheppard L, Kaufman J, Checkoway H. Referent Selection in Case-Crossover Analyses of Acute Health Effects of Air Pollution. *Epidemiology* 2001; 12: 186-92.
- 37 Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. *The Lancet* 2002; 360: 1233-1242.
- 38 Proantioquia, Cámara de Comercio de Medellín para Antioquia, El Colombiano, Universidad Eafit, Casa Editorial El Tiempo, Fundación Corona, Cámara de Comercio de Bogotá. Medellín Como Vamos: Presentación mesa de trabajo sobre aire, 2008; [internet]. Medellín; 2008 [acceso 15 abril de 2010]; 24-27. Disponible en: <http://www.medellincomovamos.org/bitcache/127a6e8099e89bf85d1f0bae446c32d2730d89fa?vid=332&disposition=inlinen&op=view>
- 39 Ortiz CH, Escobar J, García D. Contaminación atmosférica y salud: estimación de una función dosis-respuesta para Cali. Documentos de trabajo CIDSE: Universidad del Valle 1996; 1: 1-21.
- 40 Gómez A; Henao E; Molina E, Molina F. Evaluación de las partículas totales (PST) y partículas respirables (PM10) en la zona de Guayabal, Medellín, Colombia. *Revista Facultad de Ingeniería* 2003; 30: 24-33.
- 41 Lenis J, Ospina J. El material particulado respirable emitido por el parque automotor y su relación con las enfermedades respiratorias reportadas por la secretaria de salud de Medellín 2003 [Monografía de grado]. Medellín: Facultad Nacional de Salud Pública; 2003.
- 42 Martínez E. Contaminación Atmosférica: efectos sobre la salud en Medellín [internet]. Medellín; 2008 [acceso 10 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://www.medellincomovamos.org/presentacion-contaminacion-atmosferica-los-efectos-sobre-la-salud-en-medellin>.
- 43 Courant P, Porter R. Averting Expenditure and the Cost of Pollution. *Journal of Environmental Economics and Management* 1981; 8: 321-329.

PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN NIÑOS PREESCOLARES Y SU RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN DE CONTAMINANTES EN EL AIRE EN LA CIUDAD DE MEDELLÍN (COLOMBIA)

Ana Milena Herrera Torres*
Carlos Alberto Echeverri Londoño**
Gabriel Jaime Maya Vasco***
Jaime Eduardo Ordóñez Molina****

Recibido: 10/09/2010

Aceptado: 20/05/2011

RESUMEN

Este estudio fue realizado por la Universidad de Medellín y la Universidad CES para la Secretaría de Salud del municipio de Medellín durante el período comprendido entre diciembre de 2006 y noviembre de 2007. El objetivo fue establecer la asociación entre la concentración de varios contaminantes atmosféricos en la ciudad de Medellín y la presencia de patologías respiratorias en niños escolarizados.

Se trató de un estudio observacional, analítico, de cohorte, en una población de niños con edad igual o inferior a cinco años. En el estudio se encontró que los niños que residían en zonas de Medellín con altos niveles de PM_{2.5}, PM₁₀, hollín y plomo en el aire aumentan el riesgo de sufrir infecciones respiratorias o crisis asmáticas en un 49.3%.

Palabras clave: contaminación atmosférica, partículas finas, partículas respirables y patologías respiratorias.

* MD, Ph. D. Docente Facultad de Medicina de la Universidad CES. Investigadora Grupo Bioestadística. Dirección: Calle 10A N° 22-04. Teléfono: 444 05 55 extensión 327. Correo electrónico: aherrera@ces.edu.co. Fax: (04) 268 28 76

** Ingeniero químico, M. Sc. Ingeniería Ambiental. Jefe del programa de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Medellín. Investigador del Grupo de Investigaciones y Mediciones Ambientales. Dirección: Carrera 87 N° 30-65 bloque 4 oficina 104. Teléfono: 340 52 34. Correo electrónico: cecheverri@udem.edu.co. Fax: (574) 340 52 16

*** Ingeniero sanitario. M. Sc. Epidemiología. Docente del programa de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Medellín. Investigador del Grupo de Investigaciones y Mediciones Ambientales. Dirección: Carrera 87 N° 30-65 bloque 4 oficina 101. Teléfono: 340 54 07. Correo electrónico: gjmaya@udem.edu.co. Fax: (574) 340 52 16

**** MD Ph. D. Epidemiología. Docente Área de Epidemiología de la Universidad CES. Investigador del Grupo de Investigación en Epidemiología y Bioestadística. Dirección: Calle 10A N° 22-04. Teléfono: 444 05 55 extensión 650. Correo electrónico: jordonez@ces.edu.co. Fax: (04) 268 28 76

RESPIRATORY PATHOLOGIES IN PRESCHOOL CHILDREN AND THEIR ASSOCIATION TO AIR POLLUTANT CONCENTRATION IN MEDELLIN CITY (COLOMBIA)

ABSTRACT

This study was conducted by Universidad de Medellín and Universidad CES for Medellín Municipality Health Secretariat from December 2006 to November 2007. The purpose of this study was to establish the association between concentration of several air pollutants in Medellín City and the presence of respiratory pathologies in school children.

It was a cohort analytical observational study conducted to children of 5 years or younger. It was found that children residing in Medellín areas having PM_{2.5} and PM₁₀ levels of soot and lead in air are at a higher risk (49.3%) of suffering from respiratory infections or asthmatic disorders.

Key words: air pollution; fine particles; breathable particles; respiratory pathologies.

INTRODUCCIÓN

En muchas ciudades de América Latina la contaminación del aire es un problema importante de salud pública. La exposición a los contaminantes del aire de la población, que habitualmente se encuentran en las grandes ciudades, está asociada a un mayor riesgo de mortalidad y morbilidad por enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Según la Organización Mundial de la Salud, la exposición a las partículas y al O_3 supone graves riesgos para la salud en muchas ciudades de los países desarrollados y en desarrollo. Es posible establecer una relación entre el nivel de contaminación y parámetros como la mortalidad o la morbilidad [1].

En América Latina se han desarrollado diferentes estudios para evaluar el efecto de la contaminación en la salud. Estos incluyen estudios de mortalidad y estudios sobre los efectos de las partículas suspendidas en los síntomas y funciones respiratorias entre niños y adultos. En Brasil, Chile y México se han realizado estudios sobre los efectos de la contaminación por partículas suspendidas totales sobre la mortalidad. En São Paulo se relacionó un aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la concentración de partículas respirables con un aumento de 3% en la mortalidad diaria de adultos mayores de 65 años [2]. En Chile, se reportó un aumento de 0.8% (IC95%: 0.6-1.2%) en la mortalidad diaria debido a un aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la concentración de partículas respirables [3]. En México, se observó un aumento de 0.5% (IC95%: 0.3-0.7%) de la mortalidad diaria por un aumento similar en la concentración de las partículas suspendidas totales diarias [4]. Estos resultados concuerdan con estudios similares realizados en otros lugares del mundo [5].

En Colombia, se estima que el costo promedio anual debido a la contaminación del aire en zonas urbanas es de 1.5 billones de pesos, donde el 65% está asociado con mortalidad y 35% con morbilidad. Además, se considera que las partículas suspendidas causan alrededor de 6.000 muertes

prematuras; 7.400 nuevos casos de bronquitis crónica; 13.000 hospitalizaciones y 255.000 visitas de emergencia anualmente en las grandes ciudades del país [6]. A pesar de esto, el país no cuenta hoy con lineamientos nacionales para la formulación de estrategias coordinadas, eficientes y equitativas, dirigidas a prevenir y controlar la contaminación del aire. Por fortuna, en los últimos años, la creciente preocupación por los graves efectos que tiene la contaminación sobre la salud de las personas se está viendo reflejada en los grandes esfuerzos aislados, de carácter local y sectorial, dirigidos a monitorear y vigilar los niveles de contaminación en las diferentes ciudades del país (Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla, El Valle de Sogamoso, Bucaramanga, Cartagena y Pereira); pero estas acciones no han sido evaluadas, sus logros no están documentados y sus beneficios son difícilmente comparables entre sí [7].

La contaminación atmosférica en los centros urbanos de nuestro país es un problema ambiental que solamente en los últimos años ha comenzado a recibir la atención que merece por parte de las autoridades y la comunidad científica. El crecimiento económico trae consigo el deterioro ambiental de las ciudades. Es por eso que los estudios tendientes a buscar algún tipo de asociación entre la contaminación del aire y los problemas de salud pública en Medellín son relativamente nuevos. Para destacar están los realizados por Combas y Palacio en 1997, y REDAIRE en 2005 [8, 9].

La Secretaría de Salud del municipio de Medellín, siendo coherente con las Políticas Nacionales, expresadas en el documento CONPES 3344 de marzo 14 de 2005 y con el Plan Regional sobre Calidad del Aire Urbano y Salud para el período 2000-2009 formulado por la Organización Panamericana de la Salud, da un paso importante al igual que otras instituciones del país, a la comprensión de la problemática de la contaminación atmosférica nacional. Este estudio fue realizado por la Universidad de Medellín y la Universidad CES para la Secretaría de Salud del municipio de

Medellín durante el periodo comprendido entre diciembre de 2006 y noviembre de 2007.

El objetivo de esta investigación es establecer la asociación entre la concentración de los principales contaminantes atmosféricos de Medellín y la manifestación de enfermedades respiratorias en niños menores de seis años.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional, analítico, de tipo cohorte, en una población de niños con edad igual o inferior a cinco años residentes en la ciudad de Medellín.

1.2 Universo, población y muestra

El universo fueron todos los niños con edad igual o inferior a cinco años que vivían en zonas de la ciudad de Medellín con diferentes niveles de contaminación atmosférica. La población fueron todos los niños con edad igual o inferior a cinco años residentes en Medellín durante los años 2006 y 2007; la muestra se tomó de dicha población con los siguientes parámetros:

- Riesgo de enfermar en expuestos a la contaminación: 14%
- Riesgo de enfermar en no expuestos a la contaminación: 7%
- Razón no expuestos/expuestos: 1/1
- Nivel de confianza: 95%
- Potencia: 80%

Con base en las anteriores medidas, se obtuvo un tamaño de muestra de 328 niños con edad igual o inferior a cinco años en cada brazo de la investigación (expuestos/no expuestos); asimismo, y considerando que la probabilidad de pérdidas por tratarse de un estudio observacional podría llegar a ser de 10% durante los nueve meses de seguimiento de la población, se consideró finalmente un tama-

ño de muestra de 720 niños, es decir, 360 niños expuestos y 360 niños no expuestos.

1.3 Unidad de análisis

La unidad de observación y de análisis fueron todos los niños que ingresaron al estudio. La variable independiente fue el nivel de contaminación atmosférica por partículas respirables (PM10) al que estuvo expuesta la población de estudio.

La variable dependiente fue el número de consultas al médico general y al especialista, tanto de urgencias como electivas por motivo de patologías respiratorias que tuvieron los niños preescolares durante el periodo de observación, así como los costos directos generados por la atención de dichas patologías, incluyendo los días de estancia hospitalaria que generaron tales consultas.

1.4 Criterios de inclusión

- Niños con edad igual o inferior a cinco años que residían en Medellín entre el 1° de septiembre de 2006 y el 31 de mayo de 2007.
- Niños que asistieron a instituciones educativas en Medellín. Estas instituciones contaron por lo menos con un censo de 50 niños con edad igual o inferior a cinco años al momento del inicio de la observación.

1.5 Criterios de exclusión

- Niños que residían en sitios sin acceso telefónico.
- Niños que no contaban con un adulto responsable.

1.6 Área geográfica del estudio

El área de estudio fueron cuatro zonas de Medellín que cumplieron con el siguiente requisito respecto a la concentración de partículas respirables PM10 según la normativa vigente para Colombia, así:

- 50% o menos de la norma anual de calidad del aire para PM10.

- 51% al 75% de la norma anual de calidad del aire para PM10.
- 76% al 100% de la norma anual de calidad del aire para PM10.
- Más del 100% de la norma anual de calidad del aire para PM10.

1.7 Parámetros seleccionados

En el presente estudio se consideró importante determinar las concentraciones de partículas finas (PM2.5), partículas respirables (PM10), ozono (O₃), plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr) y hollín.

1.8 Sitios de medición

La tabla 1 presenta la ubicación de los sitios de muestreo para PM10, PM2.5 y O₃ por zonas. La clasificación de las zonas se hizo según los reportes de calidad del aire emitidos por REDAIRE y algunos estudios realizados en la ciudad de Medellín [10, 11].

Tabla 1. Ubicación de los sitios de muestreo.

Zona	Punto	Ubicación
Contaminación alta	1	Centro de Medellín
	2	Guayabal
Contaminación media alta	3	Andalucía
	4	Castilla
Contaminación media baja	5	El Estadio
	6	Robledo
Contaminación baja	7	Santa Elena
	8	Belén Los Alpes

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces – Universidad de Medellín. Elaboración propia

1.9 Control de errores y sesgos

Para controlar el sesgo de selección, tanto de la población expuesta como de la no expuesta, las instituciones educativas participantes se eligieron por medio de un muestreo simple aleatorio del listado de instituciones preescolares registradas en la Secretaría de Educación de Medellín.

La información se tomó cada dos meses con el fin de evitar el sesgo de memoria por parte de los padres. Asimismo, se estandarizó la forma de hacer el cuestionario para que todas las personas que colaboraron en el diligenciamiento de la encuesta registraran la información de la misma forma, asegurando que ambos grupos (expuestos y no expuestos) hubiesen sido interrogados en forma idéntica independientemente de la exposición.

1.10 Plan de análisis y tabulación de los datos

Se hizo inicialmente un análisis univariado de todas las variables de estudio, y una distribución de frecuencias. El análisis inicial permitió comparar los dos grupos en estudio, de esta forma se pudo establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos que pudieran afectar los eventos a evaluar. Para este análisis se utilizó la prueba Chi cuadrado como estadístico para las variables cualitativas y la prueba t-Student para las variables cuantitativas; asimismo se definió el valor de $p < 0.05$ para considerar que existen diferencias significativas entre ambos grupos.

Se calculó el riesgo relativo (RR) con un intervalo de confianza del 95% (CI95%) considerando como variables independientes: consulta externa por infección respiratoria aguda (IRA), consulta de urgencias por IRA, consulta externa por asma, consulta de urgencias por todos los tipos de asma, consulta de urgencias por asma leve, moderada y severa, consulta externa y de urgencia por neumonía y necesidad de hospitalización por IRA, asma o neumonía.

Estos análisis se hicieron con cuatro puntos de corte de contaminación diferentes con el fin de establecer el nivel crítico en el que la contaminación atmosférica afecta las patologías respiratorias de la población preescolar. El análisis de datos se acompañó de una descripción de los costos por la atención médica, en el que se consideró el valor de las atenciones, procedimientos, intervenciones y estancia hospitalaria basados en la normativa

vigente, y los medicamentos, con base en el manual de precios de medicamentos PLM.

2 RESULTADOS

2.1 Concentración de los contaminantes del aire

Las tablas 2 y 3 presentan los resultados de las concentraciones promedio, máximo y mínimo de las partículas PM2.5, PM10, Ozono, Pb, Cd y Cr total y hollín registradas en los diferentes sitios de muestreo.

Tabla 2. Concentración a condiciones de referencia de las partículas respirables (PM10), partículas finas (PM2.5) y ozono (O3) en los diferentes sitios de muestreo.

Sitio de Muestreo	Valor	Concentración ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		
		PM10	PM2.5	O3
Guayabal	Promedio	46	34	81
	Máximo	92	53	115
	Mínimo	19	15	39
Andalucía	Promedio	62	40	86
	Máximo	124	65	136
	Mínimo	28	22	39
Castilla	Promedio	50	36	61
	Máximo	76	63	124
	Mínimo	35	21	25
Estadio	Promedio	43	31	88
	Máximo	58	44	122
	Mínimo	21	10	42
Robledo	Promedio	59	32	60
	Máximo	114	56	91
	Mínimo	25	13	26
Santa Elena	Promedio	31	15	85
	Máximo	94	24	122
	Mínimo	13	8	30
Belén Los Alpes	Promedio	47	38	79
	Máximo	81	74	113
	Mínimo	25	14	26
Centro de Medellín	Promedio	65	32	59
	Máximo	94	59	95
	Mínimo	23	10	29

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces - Universidad de Medellín. Elaboración propia.

Tabla 3. Concentración a condiciones de referencia de metales (Pb, Cd y Cr) y hollín en los diferentes sitios de muestreo.

Sitio de Muestreo	Valor	Concentración ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)			
		Pb	Cd	Cr	Hollín
Guayabal	Promedio	0.150	0.012	0.108	5.96
	Máximo	0.385	0.019	0.455	21.662
	Mínimo	<L.D.M.	<L.D.M.	<L.D.M.	1.238
Andalucía	Promedio	1.464	0.010	0.014	6.26
	Máximo	3.722	0.017	0.035	16.416
	Mínimo	0.002	<L.D.M.	<L.D.M.	2.135
Castilla	Promedio	0.210	0.101	0.015	5.33
	Máximo	0.882	0.799	0.035	8.206
	Mínimo	0.004	<L.D.M.	<L.D.M.	1.916
Estadio	Promedio	0.099	0.011	0.020	4.97
	Máximo	0.315	0.018	0.096	7.721
	Mínimo	0.001	<L.D.M.	<L.D.M.	0.620
Robledo	Promedio	0.234	0.008	0.034	6.51
	Máximo	1.109	0.020	0.143	16.455
	Mínimo	<L.D.M.	<L.D.M.	<L.D.M.	1.235
Santa Elena	Promedio	0.010	0.002	0.005	4.15
	Máximo	0.012	0.003	0.009	13.377
	Mínimo	<L.D.M.	<L.D.M.	<L.D.M.	1.627
Belén Los Alpes	Promedio	0.126	0.004	0.008	5.08
	Máximo	0.403	0.005	0.035	9.538
	Mínimo	<L.D.M.	<L.D.M.	<L.D.M.	1.754
Centro de Medellín	Promedio	0.340	0.011	0.015	6.74
	Máximo	0.996	0.022	0.046	18.488
	Mínimo	0.004	<L.D.M.	<L.D.M.	2.018

Nota: < L.D.M. = Concentración por debajo del límite de detección del método analítico

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces - Universidad de Medellín. Elaboración propia.

2.2 Análisis univariado

Al momento del ingreso se evaluaron las características sociodemográficas y de antecedentes personales y familiares de la población de estudio. El 54.9 % de los niños pertenecía al sexo masculino y el 45.1% al sexo femenino. La media de la edad

de la población de estudio fue 4.3 ± 1.2 años; el promedio del tiempo de amamantamiento de estos niños fue de 10.5 ± 9.5 meses, con un valor máximo de 4 años. Un 74.2% de los niños no presentaron antecedentes de asma.

Las condiciones de la vivienda también fueron evaluadas, entre ellas la altura a la cual se encontraban estas, cuyo promedio fue el piso 2.5 ± 1.9 . Un 97.9% de las viviendas tenían como material de construcción el ladrillo y un 1.2% estaban fabricadas en tapia. El material de los pisos de las viviendas en un 99.5% eran de material duro como baldosa o cemento y solamente un 0.5% tenía como material arena o alfombras. En cuanto a la tenencia de mascotas en los hogares el 70.9% manifestó no tenerlas y un 29.1% manifestó tener mascotas como perros, gatos y otros. En la cocción de alimentos un 31.1% utiliza energía eléctrica, un 67.6% utiliza gas y un 1.3% utiliza leña.

Al final de los ocho meses de seguimiento de la población, la mitad de ella había consultado por una patología del sistema respiratorio. Considerando que la unidad de análisis fueron los niños y no las patologías respiratorias, cada niño que consultó por patologías respiratorias se consideró una sola vez, independientemente del número de consultas que realizara durante el período de observación.

Esta población generó 490 consultas durante el período de observación, es decir, por cada 100 niños hubo 70.4 consultas médicas. Un 50.4% de los niños consultó por urgencias, el diagnóstico de IRA predominó con un 82.9%, seguido por el asma en sus diferentes estados (leve, moderada y severa) en un 16.7% y solamente un 0.4% fue diagnosticado como neumonía.

2.3 Análisis bivariado

Se calculó el riesgo relativo de presentar patologías respiratorias de forma individual para cada uno de los contaminantes en diferentes momentos, pues durante el tiempo de observación se hicieron ocho evaluaciones, lo que permitió determinar la velocidad a la que enfermó la población.

Para la evaluación del riesgo de enfermar por O_3 , se consideró como grupo expuesto el conformado por aquellos niños cuyos sitios de permanencia presentaron una concentración superior al que permite la norma para un período de 8 horas. Para evaluar el riesgo de presentar patologías respiratorias en la población de estudio, secundario a la exposición a partículas $PM_{2.5}$, se consideró como grupo no expuesto los niños que estuvieran en los sitios arrojados por el análisis de clúster (ver tabla 4), aunque los niveles son superiores a los que permite la norma. Al calcular el riesgo de sufrir patologías respiratorias secundarias a la exposición de PM_{10} , se definió como grupo expuesto el de los niños en cuyos sitios de permanencia se encontró un nivel de PM_{10} entre el 76% y la norma anual de calidad del aire estipulada por la norma vigente. Como grupo no expuesto se consideró a aquellos niños cuyos sitios de permanencia tuvieran una concentración de PM_{10} igual o inferior al 75% de lo exigido por la norma.

Tabla 4. Agrupación de clúster jerárquico.

Parámetros	Sitios de muestreo			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
PM_{10}	1, 3 y 6	2, 8, 5 y 4	7	
$PM_{2.5}$	1, 6, 5, 2, 4, 8 y 3	7		
O_3	1, 6 y 4	2 y 8	3, 7 y 5	
Todos	1, 6, 5, 8 y 7	2	4	3

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces - Universidad de Medellín. Elaboración propia.

Una vez clasificados los grupos de expuestos y no expuestos se procedió a calcular el riesgo de enfermar por patologías respiratorias, durante un período de ocho meses en niños preescolares expuestos a los niveles de O_3 , $PM_{2.5}$ y PM_{10} (ver tabla 5). Se aceptó como asociación estadísticamente significativa, aquella en que el intervalo de confianza no pasara por la unidad, aunque el valor de p fuese un poco mayor a 0.05.

Tabla 5. Riesgo de enfermar por patologías respiratorias en niños preescolares expuestos a altos niveles de O₃, PM_{2.5} y PM₁₀. Medellín, 2007. N = 690.

Tiempo	O ₃		PM _{2.5}		PM ₁₀	
	RR (IC95%)	Valor p	RR (IC95%)	Valor p	RR (IC95%)	Valor p
Mes 1	0.99 (0.73 – 1.34)	0.925	2.70 (1.23 – 5.91)	0.006	1.83 (1.35 – 2.47)	0.000
Mes 3	1.14 (0.91 – 1.43)	0.244	1.82 (1.12 – 2.97)	0.008	1.40 (1.15 – 1.79)	0.002
Mes 5	1.15 (0.96 – 1.39)	0.137	1.65 (1.10 – 2.47)	0.006	1.22 (1.00 – 1.47)	0.049
Mes 7	1.13 (0.95 – 1.33)	0.170	1.36 (0.98 – 1.88)	0.046	1.19 (1.00 – 1.41)	0.049
Mes 8	1.16 (1.00 – 1.34)	0.056	1.44 (1.06 – 1.96)	0.008	1.17 (1.01 – 1.36)	0.044

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces – Universidad de Medellín. Elaboración propia.

Para el análisis del hollín y los metales, se agruparon las categorías según la similitud de los niveles de concentración, pues actualmente el país no cuenta con una norma que regule los niveles de estos contaminantes en el aire. Es importante aclarar que el plomo y el cadmio, aunque tienen norma de calidad del aire, estas están dadas para la fracción total y no para la fracción fina (PM_{2.5}). En ese orden de ideas, el grupo de exposición al hollín fueron los niños cuyos sitios de permanencia presentaron una concentración de este contaminante $\geq 5 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

La evaluación del riesgo de presentar patologías respiratorias secundarias a la exposición atmosférica al plomo consideró como grupo expuesto aquellos niños cuyos sitios de permanencia tuvieran una concentración $\geq 0.099 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Este grupo se contrastó con la población que estuvo expuesta a una concentración de plomo de $0.010 \mu\text{g}/\text{m}^3$, el cual se consideró como grupo no expuesto. Asimismo, la valoración del riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias por exposición al cadmio, donde se consideró como grupo expuesto aquellos niños en cuyos sitios de permanencia se encontró una concentración $> 3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y como no expuesto los niños cuyos sitios de permanencia registraron una concentración $< 3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (ver tabla 6).

2.4 Análisis ajustado

El análisis anterior se ajustó por las diferentes variables de control. Al ajustar por sexo, se en-

contraron diferencias significativas en el riesgo de enfermar al considerar la exposición a las partículas PM_{2.5} y PM₁₀, hallándose un mayor riesgo de enfermar en las mujeres (ver tabla 7)

Tabla 6. Riesgo de enfermar por patologías respiratorias en niños preescolares expuestos a niveles de hollín, plomo y cadmio, durante un período de seguimiento de ocho meses. Medellín, 2007. N = 690.

Tiempo	RR (IC95%)	Valor p
Mes 1	2.70 (1.23 – 5.91)	0.006
Mes 3	1.82 (1.12 – 2.97)	0.008
Mes 5	1.65 (1.10 – 2.47)	0.007
Mes 7	1.36 (0.98 – 1.88)	0.046
Mes 8	1.44 (1.06 – 1.96)	0.008

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces – Universidad de Medellín. Elaboración propia.

Ajustando por edad, se encontraron diferencias significativas en el riesgo de enfermar al considerar la exposición a las partículas PM₁₀ (ver tabla 8).

Al ajustar por los antecedentes personales de asma de la población de estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los preescolares cuyas madres refirieron antecedentes de asma y aquellos en que no se refirieron dichos antecedentes. De igual forma, al ajustar por el tiempo de lactancia que recibieron los niños, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos que fueron amamantados

Tabla 7. Riesgo de enfermar por patologías respiratorias, ajustado por sexo, durante un período de ocho meses en niños preescolares expuestos a altos niveles de PM 2.5 y PM10, Medellín, 2007. N = 690.

Tiempo	Mujeres (Niñas) N = 311				Hombres (Niños) N = 379			
	PM2.5		PM10		PM2.5		PM10	
	RR (IC95%)	Valor p	RR (IC95%)	Valor p	RR (IC95%)	Valor p	RR (IC95%)	Valor p
Mes 1	2.04 (0.79 – 5.32)	0.116	2.17 (1.40 – 3.37)	0.001	4.01 (1.02 – 15.7)	0.020	1.60 (1.06 – 2.42)	0.026
Mes 3	2.02 (1.02 – 4.04)	0.023	1.59 (1.18 – 2.15)	0.003	1.66 (0.83 -3.60)	0.123	1.33 (0.96 – 1.82)	0.086
Mes 5	1.72 (0.99 – 2.99)	0.029	1.36 (1.04 – 1.76)	0.027	1.61 (0.89 – 2.90)	0.084	1.12 (0.85 – 1.48)	0.426
Mes 7	1.36 (0.88 – 2.11)	0.128	1.30 (1.03 – 1.64)	0.034	1.38 (0.85 – 2.24)	0.164	1.06 (0.83 – 1.36)	0.660
Mes 8	1.54 (1.00 – 2.37)	0.024	1.29 (1.05 – 1.59)	0.021	1.37 (0.89 – 2.11)	0.117	1.03 (0.83 – 1.28)	0.822

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces – Universidad de Medellín. Elaboración propia

Tabla 8. Riesgo de enfermar por patologías respiratorias, ajustado por edad, durante un período de ocho meses en niños preescolares expuestos a niveles de PM10, Medellín, 2007. N = 690.

Tiempo	5 y 6 años (N = 405)		1 a 4 años (N = 285)	
	RR (IC95%)	Valor p	RR (IC95%)	Valor p
Mes 1	2.71 (1.69 – 4.34)	0.000	1.17 (0.80 – 1.73)	0.416
Mes 3	1.79 (1.27 – 2.53)	0.001	1.05 (0.79 – 1.38)	0.749
Mes 5	1.47 (1.10 – 1.97)	0.012	0.92 (0.72 – 1.17)	0.479
Mes 7	1.46 (1.13 – 1.90)	0.006	0.84 (0.68 – 1.05)	0.115
Mes 8	1.41 (1.13 – 1.76)	0.004	0.84 (0.69 – 1.03)	0.086

Fuente: Equipo técnico Universidad Ces – Universidad de Medellín. Elaboración propia

cuatro meses o más, y los que recibieron lactancia materna por un período menor. En ese mismo orden de ideas, ajustando por los antecedentes familiares de asma, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niños que los tenían y aquellos que no reportaron antecedentes de familiares con asma.

3. DISCUSIÓN

Se observa una participación importante de las partículas finas en los diferentes sitios de muestreo, representada en un porcentaje promedio de 67% del total de partículas respirables. Esta situación es preocupante debido que estas partículas representan un mayor riesgo sobre la salud, especialmente en las poblaciones más vulnerables (niños y ancianos).

Los niños con edad igual o menor a seis años, residentes en zonas de Medellín con altos niveles de PM2.5, PM10, hollín y plomo en el aire, aumentan su riesgo de sufrir infecciones respiratorias o crisis asmáticas en un 49.3% (IC 95%: 18.9% - 87.3%), al compararlos con aquellos niños expuestos a concentraciones más bajas de estos contaminantes.

Estos hallazgos se relacionan con el estudio de Lewis *et al.* [12], en el que hicieron dos modelos de regresión logística, con uno y dos contaminantes, y sus hallazgos sugirieron que las altas concentraciones en la atmósfera de las partículas PM2.5 y O₃ estaban asociadas fuertemente con efectos adversos sobre la función pulmonar, especialmente en los niños con asma severa y moderada. En los niños que reportaron infecciones respiratorias, los modelos con un solo contaminante mostraron efectos

de las partículas en las mediciones de la función pulmonar, y hubo un pequeño efecto del O₃, particularmente cuando se examinó la variación en la concentración octohoraria.

Esta investigación, tanto en el análisis bivariado sin ajustar como el ajustado, mostró mayor asociación entre la enfermedad respiratoria y las partículas PM_{2.5} que entre la enfermedad respiratoria y las partículas PM₁₀.

La asociación entre partículas PM_{2.5} y/o partículas PM₁₀, y la mortalidad por patologías cardiovasculares y respiratorias, ha sido evaluada por estudios previos. Samet *et al.* [13] determinaron que tenían evidencia consistente que demostraba que la concentración de PM₁₀ estaba asociada con las tasas de mortalidad general, así como las tasas específicas por causas cardiovasculares y respiratorias. Esta asociación con las partículas PM₁₀ no estuvo afectada por la inclusión de otros contaminantes en el modelo estadístico o por el momento en que se recolectó la información. Hallazgos similares fueron reportados por otros estudios que estuvieron basados en datos de ciudades y usaron una variedad de mediciones de partículas, incluyendo las partículas suspendidas totales (PST), hollín, PM₁₀ y PM_{2.5} [14].

4. CONCLUSIONES

En todos los sitios de muestreo, las partículas PM_{2.5} tienen la tendencia a superar la norma anual de calidad del aire (15 µg/m³). Esta situación es preocupante debido a que las partículas finas representan un mayor riesgo sobre la salud, especialmente en las poblaciones más vulnerables (niños y ancianos).

En los niños con edad igual o menor a seis años, residentes en zonas de Medellín con altos niveles de PM_{2.5}, PM₁₀, hollín y plomo en la atmósfera, aumenta el riesgo de sufrir infecciones respiratorias o crisis asmáticas en un 49.3%, al compararlos con aquellos niños expuestos a menores concentraciones de dichos contaminantes.

El 50% de la población de estudio presentó una infección respiratoria o una crisis asmática durante un período de seguimiento de ocho meses.

Los altos niveles de PM_{2.5}, PM₁₀, hollín y plomo en la atmósfera, de forma conjunta, explican el 30.6% de las infecciones respiratorias presentadas en niños de edad preescolar en Medellín.

Los costos que podrían prevenirse en la atención de las enfermedades respiratorias en niños con edad igual o inferior a cinco años en Medellín, reflejados en 30,796 consultas anuales, es de 7.350 millones de pesos.

6 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Salud del Municipio de Medellín y los centros educativos públicos y privados por el apoyo y colaboración prestada para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

- [1] OMS. «Las directrices sobre la calidad del aire en la protección de la salud pública.» [En línea], acceso 2 de noviembre 2007; Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/index.html>, 2006.
- [2] P. Saldiva, "Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brasil," *Archives of Environmental Health*, vol. 50, no. 2, pp. 159-164, 1995.
- [3] B. Ostro *et al.*, "Air pollution and health effects: A study of medical visits among children in Santiago, Chile," *Environmental Health Perspectives*, vol. 107, no. 1, pp. 69-73, 1999.
- [4] V. H. Borja-Aburto *et al.*, "Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City," *American Journal of Epidemiology*, vol. 145, no. 3, pp. 258-268, 1997.
- [5] C. A. Pope, "Health effects of particulate air pollution: Time for reassessment?," *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, no. 5, pp. 472-480, 1995.
- [6] B. Larsen, *Cost of Environmental Damage: A Socio-Economic and Environmental Health Risk Assessment*,

- Reporte, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá, 2004.
- [7] DNP, "Documento CONPES 3344. Lineamientos para la Formulación de la Política de Prevención y Control de la Contaminación del aire," 2005.
- [8] L. Combas, y A. Palacio, "Monóxido de carbono ambiental y carboxihemoglobina en agentes de tránsito municipal, Medellín 1996-1997," tesis de Especialista, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Medellín, 1997.
- [9] REDAIRE, *Efectos sobre la salud de la contaminación por ruido y monóxido de carbono y prevalencia de síntomas respiratorios en el centro de Medellín*, Reporte, Medellín, 2005.
- [10] J. Bedoya Velásquez *et al.*, "Calidad del aire en el Valle de Aburrá enero-mayo de 2005," *Boletín Redaire: Red vigilancia de la calidad del aire*, no. 17, pp. 5-15, 2005.
- [11] UdeM, y UdeA, *Consultoría para la evaluación de la calidad del aire, intensidad de ruido y sus efectos en la salud en 25 sitios de alto tráfico vehicular de la ciudad de Medellín*, Reporte, Secretaría del Medio Ambiente de Medellín, Medellín, 2006.
- [12] T. C. Lewis *et al.*, "Air pollution-associated changes in lung function among asthmatic children in Detroit," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 8, pp. 1068-1075, 2005.
- [13] J. M. Samet *et al.*, "Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994," *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 24, pp. 1742-1749, 2000.
- [14] J. M. Samet *et al.*, *The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study Part II: Morbidity and Mortality from Air Pollution in the United States*, Reporte, Health Effects Institute, Cambridge, 2000.

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Ortiz IC, Peláez CA, Orozco LY, Zuleta M. Estudio de interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias a través del ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. *Biomédica*. 2012;32(3).

Recibido: 16-06-11

Aceptado: 09-05-12

Publicación en línea: 09-05-12

Estudio de interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias a través del ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos

Study of interaction of mutagens in binary mixtures using alkaline comet assay in human lymphocytes

Interacciones genotóxicas de mutágenos en linfocitos humanos

Isabel C Ortiz ¹, Carlos A Peláez ², Luz Yaneth Orozco ³ y Margarita Zuleta †

¹ Grupo de Biología de Sistemas, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

² Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Grupo de Gestión y Modelación Ambiental, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Correspondencia:

Isabel Cristina Ortiz, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Campus Robledo, calle 78B 72A-109, Medellín, Colombia.

Tel. 4936300 ext. 854; fax 2572428, celular 3154550009

isabel.ortiz@upb.edu.co

Aportes de los autores:

Isabel Cristina Ortiz: desarrollo experimental, análisis y elaboración del artículo.

Carlos Peláez: coordinación y revisión de los protocolos experimentales y del artículo.

Luz Yaneth Orozco: análisis y elaboración del artículo.

Margarita Zuleta: diseño, dirección y coordinación del proyecto que soportó esta investigación.

Introducción. Mutágenos contenidos en mezclas complejas presentan interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas. Se desarrollan enfoques experimentales que permitan dilucidar el responsable de las interacciones en la mezcla.

Objetivo. Desarrollar un diseño experimental para comprender los procesos que se dan entre los compuestos presentes en las mezclas complejas.

Materiales y métodos. Linfocitos humanos fueron expuestos a mezclas binarias de mutágenos B[a]P DMBA, Trp-P-1 y MX durante 1 hora con y sin activación metabólica. La viabilidad se evaluó con azul de tripano y la genotoxicidad con cometa alcalino.

Resultados. Ningún hidrocarburo tuvo efecto con furanona. Con y sin S9, se observó que las interacciones tóxicas se presentaron entre hidrocarburos. Se observó sinergismo sin S9 entre B[a]P y Trp-P-1 y entre DMBA y Trp-P-1 con actividad metabólica. Sin S9 se observó interacción antagónica entre Trp-P-1+DMBA y con S9, entre Trp-P-1+MX y entre MX+DMBA. Se observó un incremento en la longitud de cola dosis dependiente. Hubo daño genotóxico medio y aumento de células dañadas. Para todas las mezclas se pudo determinar la concentración mínima en la que se observan efectos adversos y solo para algunas se determinó la concentración máxima en la cual no se observan efectos adversos.

Conclusión. Se hace un aporte para comprender los procesos que ocurren cuando en una mezcla hay presentes al menos dos mutágenos y se valida un modelo de análisis que permite dilucidar cuál compuesto tiene efecto sobre otro.

También se demostró que según el tipo de compuestos en la mezcla, se tendrá o no un umbral de riesgo.

Estudio de interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias a través del ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos

Palabras clave: genotoxicidad, mutágenos, linfocitos, ensayo cometa, nivel sin efectos adversos observados.

Introduction. Mutagens contained in complex mixtures present synergistic interactions, additive or antagonistic. Therefore the development of experimental approaches to elucidate which is the responsible agent for the effect in the mixtures.

Objective. To develop an experimental design that allows the understanding of the processes between the compounds of complex mixtures.

Materials and methods. Human lymphocytes were exposed to binary mixtures of the mutagens B[a]P, DMBA, Trp-P-1 and MX during 1 hour with or without S9. Viability was assessed with trypan blue and the genotoxicity by Comet assay.

Results. Any hydrocarbon showed effect with furanone. With and without S9, the most toxic interactions were observed between hydrocarbons. Synergistic interaction was observed without S9 between B [a] P and Trp-P-1 and between DMBA and Trp-P-1 with metabolic activity. Without S9 only was observed antagonistic interaction between Trp-P-1+DMBA and with S9 between Trp-P-1+MX and MX+DMBA. It observed an increase dose dependent in tail length. There were half genotoxic damage and increased cell damage. For all mixtures were able to determine the minimum concentration at which adverse effects are observed only for some determined the maximum concentration at which no adverse effects are observed.

Conclusion. This research makes a contribution to the understanding of the processes between mutagens present in a mixture and validates an analytical model that determines which component has an effect on another. The results also showed that depending on the type of compounds in the mixture, there will be or not a risk threshold.

Key words: genotoxicity, mutagens, lymphocytes, comet assay, no-observed-adverse-effect level.

El problema para la salud asociado a la exposición a un contaminante individual se da bajo circunstancias específicas y a una alta exposición. Muchos de los cánceres humanos están asociados con la exposición a contaminantes presentes en mezclas complejas, como industria, agua, alimentos, humo de cigarrillo, entre otros (1,2). Los mutágenos contenidos en estas mezclas llegan continuamente a la población y aunque estén en cantidades muy pequeñas, del orden de partes por billón (ppb) o partes por trillón (ppt) (dosis aparentemente permisibles) que no conllevan a muerte celular, generan acumulación de mutaciones (3) que de recaer en células somáticas, en genes involucrados en la regulación de la división celular (proto-oncogenes), en genes que participan en la reparación de daños en el ADN, en genes que participan en uniones celulares o en genes supresores de tumores pueden iniciar el proceso de carcinogénesis (4). Debido a la constante exposición a ambientes contaminados con mutágenos es importante entender las interacciones potenciales de los componentes de la contaminación, que pueden ser interacciones sinérgicas, antagónicas o aditivas (5-9).

En general los mutágenos llegan al organismo mezclados con otros compuestos mutagénicos o no y para determinar el riesgo que representa para la salud humana la presencia de estos compuestos en el ambiente es necesario conocer el efecto geno-mutagénico de la mezcla. Aunque son muy pocas las investigaciones direccionadas a evaluar el riesgo de las mezclas, en algunas se ha demostrado que diferentes combinaciones de cinco aminas heterocíclicas (HA) aumentan la producción de adenocarcinomas en el intestino de ratas (10). También se ha comprobado que los mutágenos 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona (MX) y la amina heterocíclica 2 amino-6-metildipirido(1,2-a:3'2'-d)imidazol (Glu-p-

1) al estar mezcladas aumentan la mutagenicidad indirecta de Glu-p-1. Un estudio evidenció que el cromo hexavalente mezclado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) aumenta la unión de estos compuestos con el gen P53 en células humanas de pulmón (11). En otras investigaciones se ha observado que el contenido de Benzo(a)Pireno (B[a]P) de una muestra de aire producía menos del 2% de la mutagenicidad inducida por la mezcla (12) y que mezclas complejas de compuestos aromáticos suprimieron la actividad mutagénica de B[a]P, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, (DMBA), 2-aminofluoreno y 2-acetilaminofluoreno, en *Salmonella* (13). Hermann (14) concluyó que varios hidrocarburos no mutagénicos aumentaron la mutagenicidad de B[a]P y que muchos PAH mutagénicos produjeron una disminución y algunas veces eliminaron la mutagenicidad de este hidrocarburo.

En compartimentos ambientales como aire, suelo, sedimentos, alimentos y agua se presentan frecuentemente mutágenos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de los cuales son comunes el B[a]P y el Dimetilbenzoantraceno, aminas heterocíclicas del tipo acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol (Trp P1) y además en el proceso de cloración del agua se forma la furanona MX (15-20).

Para evaluar el riesgo que constituye el ambiente, la US-EPA (21) sugiere hacerlo por medio del proceso del análisis de riesgo para la salud, con el uso de una batería de pruebas para determinar genotoxicidad y/o mutagenicidad a través de 4 etapas, que son la identificación del peligro, el análisis dosis-respuesta, análisis de exposición y caracterización del riesgo, análisis que sólo se lleva a cabo para compuestos puros. El interés por determinar el peligro de la genotoxicidad de un

compuesto puede ser su relación con cáncer u otros procesos degenerativos crónicos semejantes a vejez y enfermedades coronarias y respiratorias y dada la universalidad del ADN y del código genético es posible el uso de varios sistemas no humanos para predecir la mutagenicidad intrínseca generada por compuestos químicos. Para este análisis de riesgo genotóxico se deben tener datos de una amplia variedad de posibles efectos genéticos que puedan ser examinados y que un único test no da cuenta de la cantidad de respuestas genotóxicas que pueden ser inducidas por un compuesto (22). La US-EPA también enfatiza en la obtención de datos de geno-mutagenicidad como una parte de la evidencia de peso para el análisis de riesgo de cáncer, uno de los eventos y procesos claves que están siendo considerados es si el carcinógeno es geno-mutagénico o no (23). Los biomarcadores genotóxicos son apropiados para el análisis de riesgo ambiental, porque relacionan los daños en el DNA con subsecuentes cambios a nivel molecular, celular y de tejidos en organismos expuestos (24,25).

Las pruebas de cito y genotoxicidad para evaluar los biomarcadores de genotoxicidad usando líneas celulares son eficientes para tamizar el potencial efecto peligroso de un gran número de químicos o mezclas complejas, una de ellas es el ensayo Cometa alcalino que evalúa quiebres en el DNA, los cuales son potenciales lesiones premutagénicas y marcadores sensibles de daño genético (26). Además, con este ensayo se ha demostrado en humanos una relación entre la exposición a diversos compuestos químicos y el proceso de carcinogénesis (27,28).

Dada la dificultad de estudiar las mezclas complejas y la poca existencia de estudios y metodologías que permitan su abordaje, un punto clave para enfrentar

este problema es el diseño de enfoques experimentales que orienten en la selección de estrategias que puedan relacionar exposición, genotoxicidad, citotoxicidad, blanco a evaluar, valor predictivo de los resultados, determinar cuál(es) de sus componentes es el agente primario responsable del efecto genotóxico y para ello es necesario conocer y cuantificar los componentes presentes para poder evaluar la mezcla (29). El presente trabajo propuso un diseño experimental para comprender los procesos que se dan entre los compuestos presentes en las mezclas complejas de tal manera que se pueda iniciar el abordaje de un análisis de riesgo para estas mezclas, para lo cual se estudio la interacción genotóxica de los mutágenos benzo(a)pireno, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, acetato de 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido-(4,3-b)indol, y 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona en mezclas binarias a través del ensayo Cometa Alcalino en linfocitos humanos.

Materiales y métodos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de grado analítico, obtenidos de Sigma Aldrich, MOLTOX-Molecular Toxicology Inc y Merck.

Diseño experimental

El diseño experimental propuesto para evaluar la interacción de dos mutágenos se basó en definir la mínima concentración genotóxica común a los dos, luego se mezclaron diferentes concentraciones genotóxicas del mutágeno 1 con una concentración fija del mutágeno 2 y viceversa. De esta manera se pudo dilucidar cuál de los mutágenos fue el responsable de la interacción, ya que cuando cambió el efecto en alguna de las concentraciones del mutágeno 1 quien ejerció la acción fue el mutágeno 2 que se adicionó.

Cultivo de linfocitos

Las muestras de sangre fueron obtenidas de un voluntario joven (25 años), saludable, no fumador, sin ningún tipo de tratamiento clínico, no deportista. 1,0 mL de sangre venosa heparinizada, 0,2 mL de fitohemaglutinina (PHA) se adicionaron a 8 mL de medio RPMI-1640, suplementado con 5% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (56 °C, 30 minutos), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y se cultivaron por 48 horas a 37°C (30,31). Luego, la sangre se centrifugó y el precipitado de células se depositó en un gradiente de densidad de Hystopaque. Posterior a la centrifugación (2.000 rpm, 25 °C, 30 min), se colectaron los linfocitos y se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) (1.200 rpm, 7 min) (32). Posteriormente, se hicieron los tratamientos respectivos como se describe a continuación.

Citotoxicidad

Se realizaron curvas de citotoxicidad para cada mutágeno utilizado y se definió la concentración inhibitoria 50 (IC50) de cada uno y a partir de estos resultados se eligió la concentración que presentó una citotoxicidad máxima del 30±5% (citotoxicidad moderada), con el fin de evitar falsos positivos en la genotoxicidad, ya que estos efectos están asociados con citotoxicidad nula a moderada (33). Se utilizó el colorante de exclusión azul de tripano para evaluar la citotoxicidad de los linfocitos después de 1h de exposición a los mutágenos individuales. Esta metodología se basa en que las células muertas pierden la capacidad de permeabilidad selectiva y por lo tanto el colorante ingresa por difusión a ellas adquiriendo una coloración azul, en contraste, las células vivas son refringentes y

selectivas al colorante. La cuantificación de la citotoxicidad se evaluó con doble ciego.

Genotoxicidad

Los linfocitos fueron resuspendidos en PBS a una concentración de 5×10^4 células/250 μL (34) y se sometieron a los mutagénos individuales y a las mezclas binarias por 1 h en presencia o no de un sistema metabólico exógeno (fracción microsomal S9), como control negativo se utilizó el PBS, como control de solvente DMSO (1%) y como control positivo H_2O_2 (50 μM).

La genotoxicidad se evaluó por medio del ensayo Cometa alcalino que se basa en que los daños en el ADN nuclear generados por un agente genotóxico que no causa ligamientos cruzados, produce fragmentos de ADN de bajo peso molecular, generados por quiebres directos de cadena doble o sencilla o indirectamente por reparación por escisión incompleta o por la formación de sitios lábiles al álcali. Estos fragmentos de ADN se liberan durante el período de desenrollamiento alcalino y generan la cola del cometa durante la electroforesis. El ADN de alto peso molecular no migra y forma la cabeza del cometa, así mientras mayor sea el daño y la fragmentación generados por el compuesto genotóxico, mayor será la longitud de la cola del cometa. Se siguió la metodología propuesta por Singh et al en 1988 (35), en resumen, se tomaron 20 μL de cada suspensión celular y se mezclaron con 80 μL de agarosa de bajo punto de fusión (0,5%, 37 °C), en PBS libre de calcio y magnesio, con el fin de formar una suspensión de células en agarosa. 100 μL de cada suspensión se colocó en un porta objetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal (1%), luego de poner los cubreobjetos, se llevaron las placas a 4°C para permitir la solidificación de la

agarosa. Al finalizar el tiempo, se retiraron los cubreobjetos y se adicionó la tercera capa de agarosa (100 μ L de agarosa de bajo punto de fusión), de nuevo se llevaron a 4°C para su solidificación. Después de remover los cubreobjetos, las muestras se sometieron a solución de lisis recién preparada (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM de Tris, 10 g/L de N-Lauril sarcosinato de sodio y 1% de Tritón X-100 a un pH de 10, ajustado con NaOH) a 4°C, durante 1 hora. Al finalizar este tiempo, las placas se lavaron con PBS y para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión de los sitios lábiles al álcali se cubrieron con buffer de electroforesis (300 mM de NaOH y 1 mM de Na₂EDTA a pH=13) por 20 minutos.

Posteriormente, se corrió la electroforesis por 30 minutos, a 25 mV (1.1 V/cm) y 300 mA. Luego, las placas fueron neutralizadas sometiéndolas a tres lavados durante 5 minutos con buffer neutralizante frío (0,4 M de Tris buffer a pH=7,5 con HCl), se fijaron con metanol y se guardaron a 4 °C en un ambiente de baja humedad, hasta su lectura. Cada placa se coloreo con bromuro de etidio (BrEt, 20 μ g/mL) y se leyó utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon), con filtro verde y con un objetivo de 40X.

Los parámetros validados para determinar daño evaluado a través de este ensayo son: Migración del ADN, concentración de ADN en la cola, momento de cola, momento Olive, entre otros (36). En este estudio se utilizó como parámetro de medida la longitud de cola (μ m) (37-40). El criterio para determinar daño genético fue la media del control más una desviación estándar más uno ($X \pm DS + 1$) y de acuerdo a este valor, se clasificó arbitrariamente, el tipo de daño (TD) en cinco categorías: TD=0, células sin daño (0-18 μ m); TD=1, células con daño bajo (19-37 μ m); TD=2, células con daño medio (38-56 μ m); TD=3, células con daño alto (57-

75 μm) y TD=4, células con daño total (mayor a 75 μm). Otro parámetro que se tuvo en cuenta para los análisis de genotoxicidad fue la frecuencia de células dañadas en cada tratamiento y cada lectura se hizo con doble ciego.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados se hicieron tres experimentos independientes (41) cada uno por duplicado y de cada tratamiento se contabilizaron 80 células (40 de cada placa), para un total de 240 células por tratamiento.

Selección de la concentración mínima en la cual se observa efecto adverso (LOAEL) para las interacciones genotóxicas

Luego de definir la IC30 para cada mutágeno se siguió con la determinación del LOAEL genotóxico común para los cuatro mutágenos usados, con el fin de dejar esta concentración como fija en las interacciones, este valor fue de 1 μM con y sin actividad metabólica.

Análisis estadístico

Tanto para los compuestos puros como para las mezclas, se determinó homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene y para establecer la normalidad se utilizó Kolmogorov-Smirnov.

Para comparar el efecto genotóxico (longitud de cola en μm) de las mezclas binarias de los mutágenos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) bifactorial (mezcla y concentración). Se consideraron nueve concentraciones codificadas de 0 a 8, siendo 0 la dosis correspondiente al control negativo. Las comparaciones múltiples de medias para los mutágenos, se realizaron con la prueba de Newman-Keuls, con un $\alpha = 0,05$.

Para determinar efecto de dosis, se realizó un análisis de regresión simple con una $p < 0,05$.

Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas con una $p \leq 0,05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc, Tulsa, OK, USA).

Resultados

La citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos durante 1 h a los mutágenos individuales B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica fue de nula a moderada (cuadro 1).

En las mezclas binarias, no se observó efecto citotóxico o genotóxico con y sin actividad metabólica en las mezclas correspondientes a la furanona MX variable con la concentración fija de B[a]P, DMBA y Trp P-1 y viceversa excepto con la mezcla de DMBA variable y MX fijo y con actividad metabólica, que resultó citotóxica (datos no mostrados).

En el cuadro 2 se observa citotoxicidad en algunas de las mezclas binarias superior al 40%, es decir una citotoxicidad desde moderada-alta a total. Las interacciones más tóxicas se presentaron entre los dos hidrocarburos a partir de 10 μM con y sin actividad metabólica. Sin actividad metabólica la amina Trp-P-1 a partir de 50 μM con el DMBA y con la furanona MX fue citotóxica, en cambio con actividad metabólica, se presentó citotoxicidad de esta misma mezcla con el hidrocarburo variable y con la furanona MX fija.

En el cuadro 3 y figura 1 se presentan las mezclas binarias en las cuales hubo interacción con y sin actividad metabólica, se observa interacción sinérgica sin actividad metabólica entre B[a]P y Trp-P-1 independiente de quién sea el

compuesto variable. Cuando Trp-P-1 es variable el sinergismo se presenta en las concentraciones de 20 y 40 μM , con interacción citotóxica superior al 50% a partir de 50 μM , pero cuando el B[a]P es variable el sinergismo se da a partir de 20 μM y no se presenta efecto citotóxico. La evaluación del daño en el ADN de estas mezclas, a través del ensayo cometa alcalino, mostró un aumento en la longitud de cola de 1,6 veces, además, se duplicó la frecuencia de células con daño. Con actividad metabólica esta misma mezcla presentó sinergismo hasta 40 μM , se duplicó la longitud de cola, pero el aumento de células con daño no cambió y fue altamente citotóxica por encima de 50 μM . También se observó sinergismo entre DMBA y Trp-P-1 variable hasta 50 μM solamente con actividad metabólica, se duplicó la longitud de cola, el porcentaje de células con daño fue 10 veces mayor y solo se presentó citotoxicidad alta en la concentración de 100 μM . En general todas estas interacciones presentaron tipo de daño medio.

Sin S9 solo se observó interacción antagónica entre DMBA variable desde 40 μM y Trp-P-1. El DMBA individual presentó citotoxicidad moderada en todas las concentraciones estudiadas (cuadro 1) en cambio, en esta mezcla binaria, la citotoxicidad fue casi nula, pudiéndose considerar esta mezcla anticitotóxica (cuadro 3). La genotoxicidad en la mezcla disminuyó aproximadamente 1 vez y el tipo de daño observado fue bajo, además, la frecuencia de células con daño disminuyó a un 50%.

En presencia de S9, hubo interacción antagónica entre MX variable y Trp-P-1 para todas las concentraciones utilizadas de la furanona, la disminución en la genotoxicidad de la mezcla fue superior a 1,5 veces, el tipo de daño observado fue bajo, la frecuencia de células con daño tuvo una disminución del 98,6% en la

concentración menor y la citotoxicidad fue inferior al 20%. Otra mezcla con efecto antagónico con estas mismas condiciones fue DMBA variable desde 0.01 hasta 20 μM y MX, la disminución en la genotoxicidad fue 1,5 veces, pero fue citotóxica desde 40 μM del hidrocarburo. El tipo de daño presentado fue nulo y bajo y hubo una disminución del 50% en la frecuencia de células con daño (cuadro 3 y figura 2).

Se observa el efecto de dosis obtenido mediante un análisis de regresión simple de las mezclas binarias que presentaron interacción genotóxica. Se presentó efecto de dosis en ausencia de S9 entre las mezclas B[a]P-Trp-P-1 independiente de cual compuesto era el variable y con S9 entre las mezclas B[a]P-Trp-P-1, DMBA-Trp-P-1, Trp-P-1-MX y MX-DMBA ($p < 0.001$). En general se observó un incremento en la longitud de cola relacionado con la dosis (cuadro 3), con un coeficiente de correlación superior al 90%.

Discusión

Aunque los compuestos utilizados son mutágenos y presentaron actividad genotóxica individualmente (cuadro 1), algunas de las mezclas binarias durante la exposición corta de 1h no presentaron ningún efecto con y sin actividad metabólica. Las mezclas de la furanona MX con cualquiera de los otros tres mutágenos son un ejemplo de ello, el MX es un mutágeno de acción directa en comparación con los otros tres B[a]P, DMBA y Trp-P-1 que requieren activación metabólica. En esta investigación se encontró que el MX no presenta actividad genotóxica coincidente con otros reportes, los datos sobre la actividad genotóxica del MX son contradictorios, hay reportes que indican que el MX *in vitro* es genotóxico directo (42-45) y otros que reportan que es inactivado por enzimas

metabólicas (46), en las mezclas MX variable con la concentración fija de B[a]P, DMBA y Trp P-1, la no evidencia de daño puede ser debido a una competencia por los citocromos contenidos en la mezcla S9 para la inactivación del MX y la activación de los otros mutágenos. Los sistemas de reparación del ADN requieren más de 1 h para iniciar y/o detectar el daño, sin embargo, es posible que la expresión basal de las enzimas de reparación sea suficiente para reparar las lesiones ocasionadas por el MX sin S9 (33) puesto que los otros tres mutágenos requieren activación metabólica y los linfocitos no expresan los citocromos suficientes para su inducción (33,47).

Las mezclas binarias en las cuales la amina Trp-P-1 fue variable la citotoxicidad presentada se le atribuye a la amina, ya que ella de manera individual es tóxica a partir de la dosis de 40 μ M, concentración citotóxica por debajo del IC50 (cuadros 1 y 2), en comparación con los otros dos mutágenos DMBA y MX.

Aunque los dos hidrocarburos B[a]P y DMBA no son citotóxicos individualmente en las concentraciones evaluadas, las mezclas entre ellos presentaron la mayor toxicidad. Esto puede ser debido a que muchos hidrocarburos se unen al receptor aryl hidrocarburo e inducen otros blancos del receptor aril hidrocarburo, aparte de los promotores del p450 (48,49), por ejemplo activar vías alternativas de toxicidad (50) o porque los HPA aumentan la actividad metabólica de ellos mismos y de otros generando metabolitos activos altamente tóxicos (51).

Los linfocitos pueden expresar los citocromos que metabolizan el B[a]P y la amina Trp-P-1, sin actividad metabólica se observó una **potenciación** de ambos, independientemente de quién es el compuesto variable, esto puede ser debido a que el B[a]P induce la síntesis de CYP 1A1 y 1A2, este último actúa sobre aminas

heterocíclicas (HA) y a su vez éstas inducen la producción de 1A2 (52), serían dos maneras de aumentar el metabolito activo de cada compuesto, sería un proceso de retroalimentación positiva en la inducción de los citocromos. De otro lado, la amina (Trp-P-1) puede aumentar la expresión del receptor aryl hidrocarburo, el cual se une a los PAH (B[a]P), translocándose al núcleo y convirtiéndose en un factor de transcripción para la producción de CYP1A1, que es quien lo metaboliza, aumentando de esta manera los metabolitos activos (42). La citotoxicidad presentada cuando el Trp-P-1 es variable sin S9 se debe a la citotoxicidad de este compuesto puro. Con actividad metabólica puede ocurrir que cuando el Trp-P-1 está variable se acetile por acción de enzimas de la fase II que también son inducidas y se generen metabolitos más electrofílicos muy genotóxicos (52). La mezcla DMBA-Trp-P1 variable con S9, mostró sinergismo desde la primera dosis (cuadro 3). La potenciación del DMBA sobre la amina puede ser ocasionada por la inducción de enzimas de fase II específicamente acetil transferasas cuyo sustrato son las aminas hidroxiladas por los citocromos provenientes del S9, generando metabolitos altamente genotóxicos (52,53). Sin embargo, se requiere profundizar en la identificación química de estos productos o posiblemente en la generación de nuevos compuesto.

Independiente de la actividad metabólica en las mezclas con efecto genotóxico sinérgico se observa que hay una gran cantidad de células dañadas (superior al 60%), con una viabilidad superior al 75% y con tipo de daño medio (2) (cuadro 3). Estos resultados implican que la exposición a estas mezclas y durante este tiempo constituye un mayor riesgo genotóxico. Sin embargo, como se observa en las figuras 2 y 3 en algunas el LOAEL presentado en las mezclas es más bajo que el

compuesto puro, pero presentan umbral genotóxico, es decir, se puede encontrar la máxima dosis en la cual no se observa efecto adverso (NOAEL). El hallazgo de esta dosis es el inicio para detectar dosis permisibles de exposición en las mezclas que contengan estos mutágenos a estas concentraciones (33,47,50,54). El antagonismo que se presentó se debe a que hay modulación en la inducción enzimática que lleve a que uno de los mutágenos individuales pueda ser un potente agonista de los receptores o la mezcla afecta la capacidad de inducción de los citocromos evitando así la activación de los mutágenos indirectos (55). En muchas ocasiones los componentes de una mezcla pueden interactuar por un gran número de vías sobre un blanco celular semejante a un receptor o a una enzima, dos compuestos presentes en una mezcla se pueden unir permanentemente a la enzima inhibiendo su acción o unirse a ella con una disociación constante y lenta. Por este mecanismo de acción, la inhibición de enzimas del citocromo por HPA individuales puede influir la activación de otros procarcinógenos (48).

En algunas mezclas se pudo observar efecto dosis-respuesta desde la concentración más baja empleada, mientras que otras presentaron este efecto a partir de concentraciones más altas, afirmando los modelos dosis-respuesta genotóxicos en los cuales se presenta un umbral para el efecto (54). Muy pocos mutágenos tienen un blanco celular único, muchos actúan en múltiples órganos o tienen diversos blancos dentro de la misma célula, o es posible que una célula no sea el blanco para ese compuesto (48).

En esta investigación se hace un aporte importante en el abordaje para entender los procesos que pueden ocurrir cuando en una mezcla hay presente mínimo dos

mutágenos. El diseño establecido permitió evaluar mezclas binarias a bajas dosis y poder atribuir a cuál de los compuestos se debe el efecto, ya que en las mezclas los mutágenos pueden actuar combinadamente alterando la expresión de genes, alterando el metabolismo o producción de reguladores celulares o cambiando los niveles de concentración intracelular de iones. Lo importante de este diseño es que puede ser aplicado para tener un acercamiento de lo que puede estar ocurriendo en una mezcla, puesto que para iniciar el análisis de riesgo se deben entender los mecanismos celulares y moleculares que determinan el fenómeno toxicológico o genotóxico expresado, cuantificar la dosis que se absorbe del compuesto químico o la mezcla y determinar la magnitud de la respuesta.

Establecer la concentración del mutágeno en la mezcla representa un punto crítico para el análisis, en este estudio se demuestra que la concentración de cada mutágeno en la mezcla es determinante para la producción del efecto.

Los resultados de esta investigación sugieren que no necesariamente la presencia de dos mutágenos en una mezcla implica un riesgo, sino que es necesario determinar si esto ocurre con todos los componentes de una mezcla a qué concentración y qué procesos o mecanismos están determinando este tipo de interacciones.

Debido a la dificultad de determinar como un mutágeno interactúa con el resto de componentes de una mezcla y que este campo es poco explorado pero crece en importancia, este trabajo hace un aporte al análisis de riesgo de las mezclas y un modelo de análisis que permite dilucidar cuál compuesto tiene el efecto sobre otro y también se muestra que según el tipo de compuestos en la mezcla se tendrá o no un umbral de riesgo.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses de este trabajo con los autores o con las Instituciones involucradas en el desarrollo del mismo. No existe ningún interés de sacar provecho económico o un afán de notoriedad, prestigio personal o el reconocimiento y promoción profesional.

Financiación

Colciencias código 1115-04-14719, Universidad Pontificia Bolivariana y Universidad de Antioquia.

Referencias

1. **National Research Council.** Complex mixtures: method for *in vivo* toxicity testing. Washington, D.C.: National Academy Press; 1988.
2. **Carpenter D, Arcaro K, Spink D.** Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ Health Perspect.* 2002;110:25-37.
3. **Poirier MC, Beland FA.** DNA adducts measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem Res Toxicol.* 1992;5:749-55.
4. **Kakizoe T.** Chemoprevention of cancer – focusing on clinical trials. *Jpn J Clin Oncol.* 2003;33:421-42.
5. **Williams GM, Weisburger JH.** Interactions of chemical carcinogens: environmental mutagens and carcinogens. New York: A.R. Liss Publ; 1988. p. 288-94.
6. **Deng ChZ, Fons MP, Rosenblatt J, El-Zein RA, Abdel-Rahman SZ, Albrecht T.** Nickel potentiates the genotoxic effect of benzo(a)pyrene

- in Chinese hamster lung V79 cells. *Environ Mol Mutagen*. 2006;47:150-61.
7. **Majer BJ, Hofer E, Cavin C, Lhoste E, Uhl M, Glatt HR, et al.** Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (Hep G2). *Food Chem Toxicol*. 2005;43:433-41.
 8. **Ogawa S, Hirayama T, Nohara M, Tokuda M, Hirai K, Fukui S.** The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene in *Salmonella typhimurium* strains. *Mutat Res*. 1985;142:103-7.
 9. **Wakabayashi K, Totsuka Y, Fukutome K, Oguri A, Ushiyama H, Sugimura T.** Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolines. *Mutat Res*. 1997;376:253-9.
 10. **Hasegawa R, Shirai T, Hakoi K, Takaba K, Iwasahi S, Yoshida T, et al.** Synergistic enhancement of glutathione S-transferase placental from positive hepatic foci development in diethylnitrosamine treated rats by combined administration of liver heterocyclic amines at low doses. *Jpn J Cancer Res*. 1991;82:1378-84.
 11. **Feng ZC, Hu W, Rom WN, Costa M, Tang M.** Chromium exposure enhances polycyclic aromatic hydrocarbon DNA binding at the P₅₃ gene in human lung cells. *Carcinogenesis*. 2003;24:771-8.

12. **Flessel P, Liu KS, Paz MK, Waldman J, Girman J.** Unintentional carbon monoxide deaths in California from residential and other nonvehicular sources. *Environ Health.* 1988;55:375-81.
13. **Haugen DA, Meyrick JP.** Mixtures of polycyclic aromatic compounds inhibit mutagenesis in the *Salmonella*/microsome assay by inhibition of metabolic activation. *Mutat Res.* 1983;116:257-69.
14. **Hermann M.** Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixture. *Mutat Res.* 1981;90:399-409.
15. **Fernández-Sánchez JF, Segura Carretero A, Cruces-Blanco C, Fernández-Gutiérrez A.** Highly sensitive and selective fluorescent optosensor to detect and quantify benzo(a)pyrene in water samples. *Anal Chim Acta.* 2004;506:1-7.
16. **Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, et al.** Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect.* 2002;110:451-88.
17. **International Agency for Research on Cancer.** Polynuclear aromatic compounds: chemical, environmental experimental data. Lyon: IARC; 1983.
18. **Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA.** Origins of human cancer. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p.1561-77.
19. **Orozco LY, López C, Naranjo LC, Zuleta M.** DNA damage and identification of mutagenic heterocyclic amines in municipal wastewater

which contaminate water purification plants. *Environ Mol Mutagen.* 2003;41:196.

20. **Onstad GD, Weinberg H.** Evaluation of the stability and analysis of halogenated furanones in disinfected drinking waters. *Anal Chim Acta.* 2005;534:281-92.
21. **Environmental Protection Agency.** Guidelines for mutagenicity risk assessment. Washington, D.C.: Risk Assessment Forum; 1986.
22. **Dearfield KL, Cimino M, Mc Carroll NE, Mauer I, Valcovic LR.** Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat Res.* 2002;521:121-35.
23. **Dearfield KL, Moore MM.** Use of genetic toxicology information for risk assessment. *Environ Mol Mutagen.* 2005;46:236-45.
24. **Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K.** Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res.* 2004;567:109-49.
25. **Torres Lemos A, Pereira Rosa P, VazRocha JA, Ferrao Vargas VM.** Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009;72:2058-65.
26. **Park SY, Choi J.** Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ Int.* 2007;33:817-22.
27. **Bertino J.** *Encyclopedia of cancer.* 2nd Edition. New York: Academic Press; 2002. p. 433-47.

28. **ICH Expert Working Group.** S2A: guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals. Canadá: Minister of Public Works and Government Services; 1996.
29. **National Research Council.** Environmental tobacco smoke: measuring exposures and assessing health effects. Washington: National Academy Press; 1986.
30. **Kohji Y, Kusakabe H, Tanaka N.** Comparative studies of MCL-5 cells and human lymphocytes for detecting indirect-acting clastogens. *Mutat Res.* 1998;412:55-61.
31. **Jansson K, Mäki-Paakkanen J, Vaittinen SL, Vartiainen T, Komulainen H, Tuomisto J.** Cytogenetic effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in rat peripheral lymphocytes in vitro and in vivo. *Mutat Res.* 1993;229:25-8.
32. **Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, et al.** Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res.* 1999;441:115-27.
33. **Platel A, Gervais V, Sajot N, Nessler F, Marzin D, Claude N.** Study of gene expression profiles in TK6 human cells exposed to DNA-oxidizing agents. *Mutat Res.* 2010;689:21-49.
34. **Dhawan A, Bajpayee M, Pandey AK, Parmar D.** Protocol for the single cell gel electrophoresis: comet assay for rapid genotoxicity assessment. Lucknow, India: Industrial Toxicology Research Centre; 2009.

35. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-91.
36. **Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N.** Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutat Res.* 2003;534:85-92.
37. **Brink A, Schulz B, Kobras K, Lutz WK, Stoppe H.** Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mutat Res.* 2006;603:121-8.
38. **Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi A, et al.** Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35:206-21.
39. **Trisnawaty A, Vian L, Sabatier R, Cano JP.** *In vitro* detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. *Mutat Res.* 2000;468:227-34.
40. **Uhl M, Helma C, Knasmüller S.** Single cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res.* 1999;17:441:215-24.
41. **Uhl M, Christoph H, Siegfried K.** Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res.* 1999;441:215-24.
42. **Ishiguro Y, LaLonde RT, Dence CW, Santodonato J.** Mutagenicity of chlorine-substituted furanones and their inactivation by reaction with nucleophiles. *Environ Toxicol Chem.* 1987;6:935-46.

43. **Meier JR, Knohl RB.** Mutagenic and clastogenic properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone; a potent bacterial mutagen in drinking water. *Environ Mol Mutagen.* 1987;10:411-24.
44. **Tikkanen L, Kronberg L.** Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acids identified in chlorinated drinking water. *Mutat Res.* 1990;240:109-16.
45. **LaLonde RT, Cook GP, Perakyla H, Dence CW, Babish JG.** *Salmonella typhimurium* (TA 100) mutagenicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and its open- and closed ring analogs. *Environ Mol Mutagen.* 1991;17:40-8.
46. **Kinae N, Sugiyama C, Nasuda MY, Goto K, Tokumoto K, Furugori M, et al.** Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water. *Water Sci Technol.* 1992;25:333-40.
47. **Jenkins GJ, Zair Z, Johnson GE, Doak SH.** Genotoxic thresholds, DNA repair, and susceptibility in human populations. *Toxicology.* 2010;278:305-10.
48. **Cherng SH, Lin P, Yang JL, Hsu SL, Lee H.** Benzo[g,h,i]perylene synergistically transactivates benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;170:63-8.
49. **Hestermann E, Stegeman J, Hahn M.** Relationships among the cell cycle, cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression in PLHC-1 cells. *Aquat Toxicol.* 2002;58:201-13.

50. **Pottenger L, Gollapudi B.** A case for a new paradigm in genetic toxicology testing. *Mutat Res.* 2009;678:148-51.
51. **Spink D, Spink B, Cao J, DePasquale J, Pentecost B, Fasco M, et al.** Defferential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breas tumor cells. *Carcinogenesis.* 1998;19:291-8.
52. **Ioannides C, Parke DV.** The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab Rev.* 1990;22:1-86.
53. **Hahn M.** Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact.* 2002;141:131-60.
54. **Kirsch-Volders M, Gonzalez L, Carmichael P, Kirkland D.** Risk assessment of genotoxic mutagens with thresholds: a brief introduction. *Mutat Res.* 2009;678:72-5.
55. **Spink DC, Wu SJ, Spink BC, Hussain MM, Vakharia DD, Pentecost BT, et al.** Kaminsky. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226:213-24.

Figura 1. Genotoxicidad por interacción sinérgica durante 1 hora de exposición en linfocitos humanos. a) Interacción entre Trp-P-1 (Δ) y B[a]P (\circ): Trp-P-1 (\blacktriangle) + B[a]P ($1\mu\text{M}$) y B[a]P (\bullet) + Trp-P-1 ($1\mu\text{M}$), sin actividad metabólica (a1) y con actividad metabólica (a2). b) Interacción entre Trp-P-1 (Δ) y DMBA: Trp-P-1 (\blacktriangle) + DMBA ($1\mu\text{M}$) con actividad metabólica. La magnitud del daño se basó en la longitud de migración (μm) del ADN. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO, 1%) como control del solvente, produjo una longitud de cola de $15\mu\text{m}$. A cada valor se le restó el control.

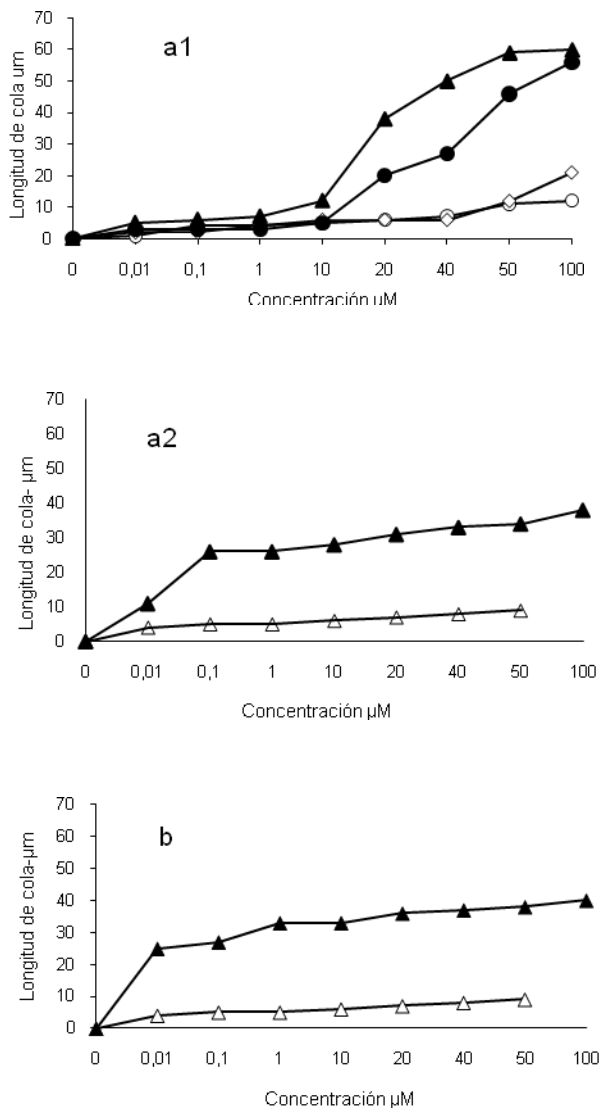
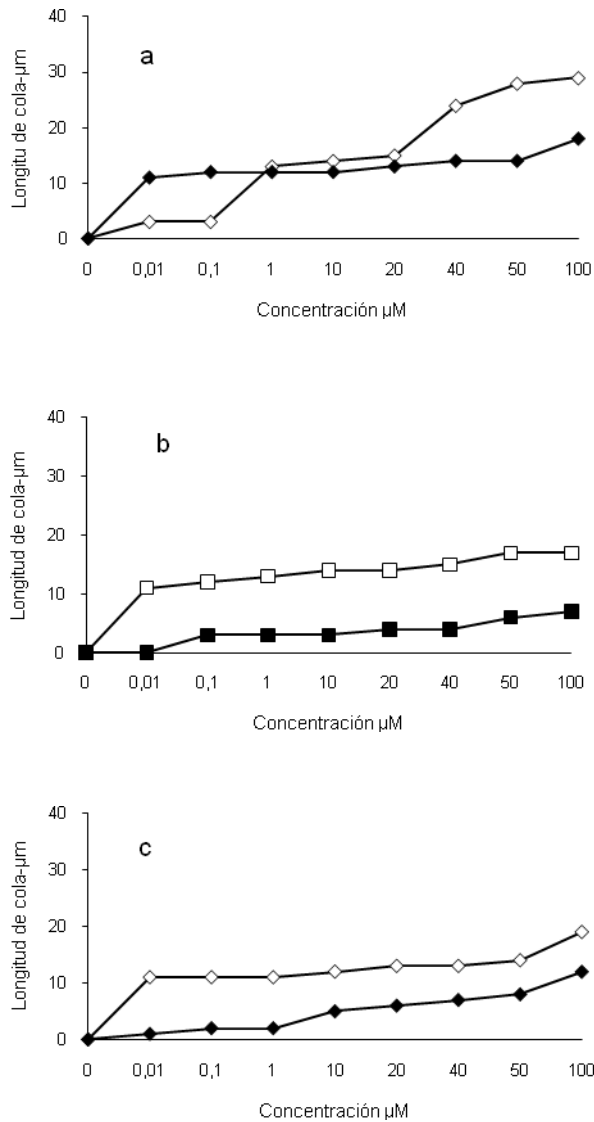


Figura 2. Genotoxicidad por interacción antagonista durante 1 hora de exposición en linfocitos humanos. a) DMBA (\diamond), Trp-P-1: DMBA (\blacklozenge) + Trp-P-1(1 μ M), sin actividad metabólica. b) MX (\square), Trp-P-1: MX (\blacksquare) + Trp-P-1(1 μ M), con actividad metabólica. c) DMBA (\diamond), MX: DMBA (\blacklozenge) + MX (1 μ M) con actividad metabólica. La magnitud del daño se basó en la longitud de migración (μ m) del ADN. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO, 1%) como control negativo, produjo una longitud de cola de 15 μ m. A cada valor se le restó el control.



Cuadro 1. Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos tratados con B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica, durante 1 h.

Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado. Se considera que una célula está dañada a partir de 19 μM (X control+1DS+1).

Compuesto	Concentración μM	X \pm DS		TD		% CD		% V	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO	1%	15 \pm 3	15 \pm 2	0	0	15	13	100	98
H ₂ O ₂	50	73 \pm 9	75 \pm 10	4	4	76	88	50	48
BP	0.01	16 \pm 4	27 \pm 4	0	1	10	51	100	89
	0.10	19 \pm 7	28 \pm 6	1	1	20	70	89	88
	1.00	19\pm3*	28\pm4	1	1	33	69	96	94
	10.00	20 \pm 1	28 \pm 3	1	1	36	70	82	97
	20.00	21 \pm 1	28 \pm 2	1	1	41	80	83	98
	40.00	22 \pm 1	28 \pm 6	1	1	45	83	91	68
	50.00	26 \pm 1	28 \pm 8	1	1	58	84	84	67
	100.00	27 \pm 4	29 \pm 5	1	1	46	89	84	67
DMBA	0.01	18 \pm 6	26 \pm 4	0	1	21	54	86	100
	0.10	18 \pm 7	26 \pm 3	0	1	23	55	75	100
	1.00	28\pm6*	26\pm5	1	1	43	55	75	100
	10.00	29 \pm 5	27 \pm 6	1	1	48	73	72	91
	20.00	30 \pm 8	28 \pm 5	1	1	61	61	69	78
	40.00	39 \pm 9	28 \pm 3	2	1	90	61	65	77
	50.00	43 \pm 9	29 \pm 9	2	1	86	66	60	76
	100.00	44 \pm 9	34 \pm 8	2	1	98	88	59	75
Trp-P-1	0.01	17 \pm 5	19 \pm 3	0	1	30	11	100	100
	0.10	17 \pm 5	20 \pm 5	0	1	30	23	100	100
	1.00	19\pm1*	20\pm1	1	1	40	23	100	100
	10.00	21 \pm 1	21 \pm 2	1	1	43	28	95	97
	20.00	21 \pm 2	22 \pm 5	1	1	50	28	88	85
	40.00	21 \pm 2	23 \pm 4	1	1	60	41	55	65
	50.00	27 \pm 7	24 \pm 5	1	1	59	49	50	58
	100.00	36 \pm 8	37 \pm 6	1	1	80	96	0	0
MX	0.01	17 \pm 4	26 \pm 3	0	1	9	70	100	100
	0.10	17 \pm 4	27 \pm 5	0	1	11	78	100	95
	1.00	19\pm1*	28\pm2	1	1	23	78	95	82
	10.00	20 \pm 2	29 \pm 3	1	1	30	85	93	81
	20.00	21 \pm 1	29 \pm 2	1	1	28	86	91	80
	40.00	23 \pm 2	30 \pm 5	1	1	41	87	91	79
	50.00	24 \pm 3	32 \pm 6	1	1	45	95	90	79
	100.00	26 \pm 4	32 \pm 5	1	1	61	95	89	78

X \pm DS: Longitud de cola \pm desviación estándar

TD: Tipo de daño

% CD: Porcentaje de células con daño

% V: Porcentaje de viabilidad

*: p<0,001

Cuadro 2. Citotoxicidad de las mezclas binarias en linfocitos humanos expuestos durante 1 h con y sin actividad metabólica. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado.

Tiempo	S9	Mezcla	NOAEL del compuesto variable (μM)	LOAEL del compuesto variable (μM)
1 h	-	DMBA + B[a]P (1 μM)	1	10
		Trp-P-1 DMBA (1 μM)	40	50
		Trp-P-1 + MX (1 μM)	40	50
		B[a]P + DMBA (1 μM)	10	20
	+	DMBA + B[a]P (1 μM)	1	10
		BP + DMBA (1 μM)	20	40
		DMBA + Trp-P-1 (1 μM)	10	20
		Trp-P-1 + MX (1 μM)	40	50

NOAEL: Máxima concentración en la cual no se observan efectos adversos citotóxicos.

LOAEL: Mínima concentración en la cual se observan efectos adversos citotóxicos.

Cuadro 3. Genotoxicidad de mezclas binarias en linfocitos humanos tratados con B[a]P, DMBA, Trp-P-1 y MX, con y sin activación metabólica (S9), durante 1 h de exposición. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y cada uno por duplicado.

Tiempo	Compuesto fijo (1µM) (X ±DS), (TD), (%CD), (%V)	Compuesto variable	Concentración (µM)	Genotoxicidad compuesto variable				Genotoxicidad mezcla				Interacción	
				(X±DS) µm	TD	%CD	%V	(X±DS)	TD	%CD	%V		
Control	DMSO	—	1%	15±3	0	15	100	—	—	—	—	—	
1h sin S9	B[a]P (19±3), (1), (33), (96)	Trp P1	0.01	17±7	0	30	100	20±3	1	16	87	ND	
			0.1	17±5	0	30	100	21±2	1	19	87		
			1	19±1	1	40	100	22±1	1	18	86		
			10	21±1	1	43	95	27±1	1	28	86		
			20	21±1	1	50	88	53±7 *	2	90	86		Sinergismo
			40	21±1	1	60	55	65±5 *	3	95	85		
	Trp P1 (19±1), (1), (40), (100)	B[a]P	0.01	16 ±4	0	10	100	18±7	0	10	95	ND	
			0.1	19 ±7	1	20	89	18±3	0	9	96		
			1	19 ±3	1	33	96	22±1	1	11	96		
			10	20 ±1	1	36	82	20±5	1	15	95		
			20	21±1	1	41	83	35±4 *	1	58	93		Sinergismo
			40	22±1	1	45	91	42±6 *	2	89	94		
	50	26±1	1	58	84	61±9 *	3	100	66				
	Trp P1 (19±1), (1), (40), (100)	DMBA	0.01	18±6	0	21	86	26±6	1	48	100	ND	
			0.1	18±7	0	23	75	27±9	1	64	97		
			1	28±6	1	43	75	28±2	1	65	96		
			10	29±5	1	48	72	27±7	1	66	95		
			20	30±8	1	61	69	28±7	1	60	80		
			40	39±9	2	90	65	29±7 *	1	68	73		Antagonismo- anticitotóxico
	50	43±9	2	86	60	29±6 *	1	71	85				
	100	44±9	2	98	59	33±9 *	1	81	83				
	1 h Con S9	B[a]P (28±4), (1), (69), (94)	Trp P1	0.01	19±3	1	11	100	26±5	1	75	84	ND
				0.1	20±5	1	23	100	41±6 *	2	99	80	Sinergismo
				1	20±1	1	23	100	41±7 *	2	100	76	
10				21±2	1	28	97	43±9 *	2	99	75		
20				22±5	1	28	85	46±9 *	2	100	74		
40				23±4	1	41	65	48±9 *	2	100	60		
50	24±5	1	49	58	49±9	2	100	7	Citotóxico				

			100	37±6	1	96	0	53±9	2	100	0	
1 h Con S9	DMBA (26±5), (1), (55), (100)	Trp P1	0.01	19±3	1	11	100	40±9 *	2	99	96	<i>Sinergismo</i>
			0.1	20±5	1	23	100	42±8 *	2	99	94	
			1	20±1	1	23	100	48±9 *	2	100	85	
			10	21±2	1	28	97	48±9 *	2	98	84	
			20	22±5	1	28	85	51±8 *	2	100	82	
			40	23±4	1	41	65	52±9 *	2	100	78	
			50	24±5	1	49	58	53±10 *	2	100	77	
			100	37±6	1	96	0	55±9	2	99	11	
	Trp P1 (28±6), (1), (43), (75)	MX	0.01	26±3	1	70	100	15±3 *	0	1	98	<i>Antagonismo</i>
			0.1	27±5	1	78	95	18±5 *	0	9	93	
			1	28±2	1	78	82	18±3 *	0	11	91	
			10	29±3	1	85	81	18±4 *	0	23	90	
			20	29±2	1	86	80	19±4 *	1	19	88	
			40	30±5	1	87	79	19±4 *	1	19	86	
			50	32±6	1	95	79	21±5 *	1	35	81	
			100	32±5	1	95	78	22±8 *	1	40	79	
	MX (28±2), (1), (78), (82)	DMBA	0.01	26±4	1	54	100	16±4 *	0	6	78	<i>Antagonismo</i>
			0.1	26±3	1	55	100	17±3 *	0	5	53	
			1	26±5	1	55	100	18±4 *	0	10	53	
			10	27±6	1	73	91	20±7 *	1	31	53	
			20	28±5	1	61	78	21±5 *	1	30	52	
			40	28±3	1	61	77	22±7	1	39	33	<i>Citotóxica</i>
			50	29±9	1	66	76	23±7	1	51	32	
			100	34±8	1	88	75	27±6	1	80	26	

X±DS: Longitud de cola ± desviación estándar.

TD: Tipo de daño

% CD: Porcentaje de células con daño

% V: Porcentaje de viabilidad.

*: p<0.001

ND: Efecto no detectable

