

2002-A

B00002577

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD AMBIENTAL



*CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES DE RIESGO PARA
CÁNCER DE MAMA, EN RATAS HEMBRA CON EXPOSICIÓN
CRÓNICA A UN XENOESTROGENO AMBIENTAL
ORGANOCLORADO (DDT).*

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
ALEJANDRO ARTURO CANALES AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS
DR. ALFREDO FERIA VELASCO

ZAPOPAN, JALISCO. DICIEMBRE DEL 2002

189834/024126
F366
y

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
 Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Maestría en Ciencias de la Salud Ambiental

SUBCOMITE DE TESIS E INVESTIGACION

Dr. Martha Georgina Orozco Medina
 Titular por el CUCBA
 Dr. Miguel Raygoza Anaya
 Titular por el CUCS
 P r e s e n t e:

Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted(es), que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realizó el pasante: **Alejandro Arturo Canales Aguirre**, con el título: **Caracterización de biomarcadores de riesgo para cáncer de mama, en ratas hembra con exposición crónica a un xenoestrogeno ambiental organoclorado (DDT).**

Manifestamos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de presentación y defensa del mismo.



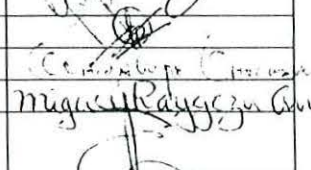
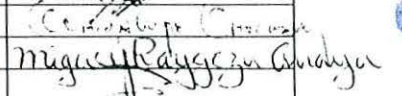
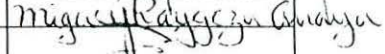

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente Guadalajara, Jal., a los 14 días del mes de Noviembre del 2002.

Dr. Alfredo Feria Velasco
Director del Trabajo de Tesis

Asesores

1. MSP. Rosa Leticia Scherman Leño
2. Dra. Martha Georgina Orozco Medina
3. M en C. Jose Luis Canales Muñoz
4. M en C. Ruth De Celis Carrillo

Sinodales	Firma
1. MSP. Rosa Leticia Scherman Leño	
2. Dra. Martha Georgina Orozco Medina	
3. Dr. Alfredo Feria Velasco	
4. Dra. Guadalupe Garibay Chavez	
5. Dr. Miguel Raygoza Anaya	
6. Dr. Javier García Velasco	
Suplente	

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

El presente trabajo se realizó con el financiamiento del Programa de Investigación Regional **SIMORELOS** con acuerdo número 20000302034 y La Fundación Mexicana para la Salud, Capitulo Jalisciense, A.C. (**Funsalud**) y fue desarrollado en la División de Patología y Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC (CONACyT).

Director de la División de Patología y Biotecnología Ambiental.

Dr. Jorge Hugo Salado Ponce.

Investigador Responsable de la Dirección de Tesis de Maestría.

Dr. en C. Alfredo Feria Velasco. Coordinación Académica y Tecnológica.
CIATEJ/CONACyT.

Dirección:

AV. Normalistas # 800

C.P. 44270

Guadalajara Jal., MEXICO.

Tel. 33 45 52 00 Ext. 1410

E-mail : aferia@ciatej.net.mx

Dedicada a mis abuelos: **José, Emilia, Benjamín y Natividad**, que forjaron el espíritu, carácter y principios de mis padres **Alejandro y Rosa María** por su gran corazón y capacidad de entrega y por brindarme siempre el deseo de superarme y seguir adelante, gracias ustedes he llegado a esta meta.

A mis hermanos, **Zulema, Norma, Manuela, Carolina y al gran George** por su cariño, comprensión y apoyo incondicional, pero sobre todo por creer en mí. A mis **tíos, primos, cuñados y sobrinos**, que siempre están a mi lado en todos los momentos difíciles de mi vida, apoyándome en todas mis decisiones.

Al doctor **Alfredo Feria**, por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación y quien ha guiado mi formación no solamente académica, sino como persona, dándome la confianza y paciencia para transmitirme sus conocimientos y experiencias, así como su valiosa amistad.

A la **Universidad de Guadalajara** y al **CIATEJ** por el apoyo institucional y por brindarme un espacio en donde formarme.

A ti **Elizabeth** por tu amor, apoyo y compañía en cada etapa del camino recorrido juntos y en aquellos momentos difíciles aún en la distancia.

Finalmente quiero agradecer profundamente a las personas que me han animado durante todo este tiempo, brindándome su apoyo y amistad incondicional y que han hecho más llevaderos los momentos difíciles. **Hugo, Edgardo, Abel, Juan, Vanessa, Nancy, Javier e Ivan**. A ustedes mil gracias por estar ahí, compartiendo los buenos y malos momentos. Quiero brindar un agradecimiento especial al **M en C. Ulises Gómez** por todos los conocimientos que compartió conmigo y por su valioso tiempo dedicado a este trabajo de tesis.

*El futuro es de los que creen
en la belleza de sus sueños.*

Eleanor Roosevelt

INDICE

RESUMEN.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Antecedentes.....	2
2.2 Factores de riesgo en cáncer de mama.....	10
2.2.1 Factores genéticos.....	10
2.2.2 Factores hormonales endógenos.....	11
2.2.3 Factores hormonales exógenos	13
2.3 Cáncer de mama y medio ambiente.....	14
2.4 Teoría básica para la formación de cáncer de mama	18
2.5 Metabolismo hormonal y cáncer de mama.....	21
2.6 Daño estructural y funcional en cáncer de mama.....	23
2.7 Plaguicidas.....	25
2.7.1 Clasificación de los plaguicidas.....	28
2.7.2 DDT.....	31
2.6.1.1 Propiedades físico-químicas del DDT.....	31
2.6.1.2 Absorción del DDT.....	32
2.6.1.3 Distribución del DDT.....	33
2.6.1.4 Metabolismo del DDT.....	33
2.6.1.5 Excreción del DDT.....	34
2.6.1.6 Grados de exposición y concentraciones en el ambiente.....	35
2.6.1.7 El DDT en México.....	35

3	OBJETIVOS	37
	3.1 Objetivo general.....	37
	3.2 Objetivos particulares.....	37
4	HIPÓTESIS.....	38
5	VARIABLES.....	39
	5.1 Operacionalización de variables.....	40
6	METODOLOGÍA.....	41
	6.1 Sujetos de experimentación.....	41
	6.2 Patrón de exposición.....	41
	6.3 Obtención de muestras.....	41
	6.4 Parámetros determinados.....	43
	6.4.1 Inmunoensayo enzimático para 2-hidroxiestróna y 16 alfa- hidroxiestróna en muestras de orina.....	46
	6.4.2 Determinación de las hormonas FSH, LH, PRL, Estradiol y Testosterona.....	46
	6.4.3 Micronúcleos en eritrocitos.....	46
	6.4.4 Micronúcleos en células de raspado de mucosa oral.....	47
	6.4.5 Electroforesis de célula única o ensayo del cometa.....	47
	6.4.6 Determinación de radicales libres mediante estudio de peroxidación lipídica.....	48
7	RESULTADOS.....	50
	7.1 Inmunoensayo enzimático para 2-hidroxiestróna y 16α- hidroxiestróna en muestras de orina.....	50
	7.2 Determinación de las hormonas FSH, LH, PRL, Estradiol y Testosterona.....	52

7.3	Micronúcleos en eritrocitos.....	53
7.4	Micronúcleos en células de raspado de mucosa oral.....	55
7.5	Electroforesis de célula única en linfocitos.....	56
7.6	Electroforesis de célula única en células mamarias.....	59
7.7	Determinación de radicales libres mediante estudio de peroxidación lipídica.....	61
8	DISCUSIÓN.....	62
9	CONCLUSIONES.....	71
10	RECOMENDACIONES.....	72
11	BIBLIOGRAFÍA.....	73
	ANEXO FOTOGRÁFICO.....	XI



RESUMEN

Introducción. En la región Occidente del país, los tumores malignos son una de las principales causas de mortalidad, actualmente ocupan el segundo lugar en el país, y es el cáncer de glándula mamaria, uno de los que se presentan con mayor frecuencia, sobre todo en mujeres en edad productiva 15-64 años. En Jalisco, el cáncer de mama en mujeres ocupa la primera posición, con una tasa de 22.64 casos por cada 100,000 mujeres lo que representa el 23.19 %, de hecho en los Estados de Jalisco, Michoacán y Colima, esta enfermedad llega a convertirse en la primera causa de mortalidad entre mujeres mayores de 25 años. Existen reconocidos factores de riesgo (genéticos y hormonales), a los cuales solo se les puede atribuir un tercio de todos los casos, que se presentan. Se estima que la incidencia de cáncer de mama aumenta anualmente 1%, lo que no ha podido ser contrarrestado con los cambios y/o atenciones que se han realizado sobre los factores de riesgo conocidos. Se conoce que en la región occidental del país se utilizan agentes tóxicos, como es el caso de insecticidas organoclorados para el control de plagas. Actualmente, se ha asociado la aparición de tumores malignos con la exposición a este tipo de agentes tóxicos. **Metodología.** Modelo experimental: Se estudiaron 30 ratas Wistar hembras, de 40 días de edad y de entre 100-150 gramos de peso, Se formó **un grupo expuesto**, con 10 ratas que se expusieron al xenoestrógeno ambiental DDT grado reactivo 98 % de pureza (SIGMA), mediante la ruta inhalatoria, a una concentración aproximada de 7 mg/m³, 8 h por día, 6 días a la semana por un periodo de 5 meses, en una cámara de exposición diseñada para este modelo; **un grupo control interno**, formado por 10 ratas, que se mantuvieron en exposición al solvente utilizado como vehículo para DDT (etanol absoluto) y un tercer **grupo como control externo** formado por 10 ratas, que fueron expuestas a aire atmosférico. Se colectaron muestras de sangre periférica, mucosa oral, orina, y tejido mamario. A estas muestras se les determinó presencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica y mucosa oral de carrillos, mediante las tinciones de Papanicolau y Writh-azul de Crecil. Se realizó electroforesis de célula única (prueba del cometa) en linfocitos aislados de sangre periférica y tejido mamario. Se determinaron los niveles de 16 α -hidroxiestróna y 2-hidroxiestróna en orina mediante un paquete de ELISA. Además, se determinó el índice de peroxidación lipídica de membranas celulares de tejido mamario. Para el análisis estadístico se utilizó el método de análisis de varianza (ANOVA). **Resultados.** La exposición crónica al xenoestrógeno ambiental DDT, produjo efectos, tanto a nivel sistémico como local en tejido mamario que, han sido relacionados con el desarrollo de carcinoma de glándula mamaria. De los principales efectos observados se encontró que existe una alteración en el metabolismo del estradiol, ya que se observó un aumento en el nivel de 16 α -OHE, el cual es considerado, como tumorigénico y genotóxico, además de poseer una alta actividad estrógenica. Se encontró un aumento en el índice de lipoperoxidación, el cual se ha relacionado con un aumento en la generación de especies de oxígeno reactivo que a su vez lleva a un estado de estrés oxidativo. Además, los resultados demostraron que la sustancia problema (DDT) resultó genotóxica, tanto en células sanguíneas como mamarías. **Conclusiones.** El aumento en el nivel del metabolito del estradiol (16 α -HOE), la determinación de radicales libres y el análisis del daño sobre el material genético, pueden ser utilizados como biomarcadores indicadores de los efectos locales y sistémicos del xenoestrógeno sobre los elementos epiteliales de la glándula mamaria, con estrecha relación con la formación de tumores malignos (carcinomas).

ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFC's	Alta Frecuencia de intercambio de cromatides Hermanas
B[a]P	Benzo[a]pireno
COV	Compuesto orgánicos volátiles
DDA	Ácido-4-clorofenil-acético
DDD	Diclodietilideno
DDE	Diclorodifenildicloroetano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DMBA	17, 2 – Dimetilbenzo[a] antraceno
E ₂	Estradiol
ES	Error estándar
ER	Receptor de estrógenos
FISH	Hibridación in-situ fluorescente
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ICH	Intercambio de cromatides hermanas
MDA	Malondialdehido
MN	Micronúcleos
-OH	Hidroxil
2-OHE	2-hidroxiestrone
16 α -OHE	16 α -hidroxiestrone
1-OH-pireno	1-Hidroxipireno
8-oxidG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
³² P	Fósforo 32
PCB's	Bifenilos policlorinados
SHBG	Hemoglobina de unión serica

1 INTRODUCCIÓN

En la región Occidente del país, los tumores malignos son una de las principales causas de mortalidad, actualmente ocupan el segundo lugar en el país, y es el cáncer de glándula mamaria, uno de los que se presentan con mayor frecuencia, sobre todo en mujeres en edad productiva (15-64) años. En este grupo de mujeres, tiene el segundo lugar en distribución 28,806 lo que representa el 13.0%, sólo superado por el cáncer de cuello de útero. Este porcentaje aumenta significativamente al observar la distribución en sexo femenino, que llega a 18.2% (SSA. 1997). En Jalisco, el cáncer de mama en mujeres, ocupa la primera posición, con una tasa de 22.64 casos por cada 100,000 mujeres, lo que representa el 23.19% (Secretaría de Salud Jalisco, 1998), de hecho, en los Estados de Jalisco, Michoacán y Colima, esta enfermedad llega a convertirse en la primera causa de mortalidad entre mujeres mayores de 25 años, (INEGI, 1999), lo que da una idea de la magnitud y gravedad del problema. La mayoría de las mujeres que mueren por causa de esta enfermedad, pierden cerca de dos décadas de su vida, de esta forma, se estima que aproximadamente dos millones de años vida-mujer productiva son perdidos anualmente por cáncer de mama en Estados Unidos y Europa. (Kohlmeier y cols., 1990). A pesar de que cerca del 87% de todos los casos sobreviven aproximadamente 5 años, cerca de la mitad de todas las mujeres mueren por causa de cáncer de mama, en la primera década después del diagnóstico (Kosary y cols., 1994).

Existen reconocidos factores de riesgo (genéticos y hormonales), a los cuales sólo se les puede atribuir un tercio de todos los casos que se presentan (Davis D. L., y cols., 1993). Se estima que la incidencia de cáncer de mama aumenta anualmente 3%, lo cual no ha podido ser contrarrestado con los cambios y/o atenciones que se han realizado sobre los factores de riesgo conocidos (Greenlee y cols., 2000).



Por lo anterior se considera necesario identificar y caracterizar, los marcadores biológicos, originados por exposición a factores ambientales como es el caso del xenoestrógeno ambiental DDT, que indiquen un riesgo de desarrollar dicha patología.

Se conoce que en la región occidental del país se utilizan agentes tóxicos e hidrocarburos (comunicación personal, Dra. Janeth de Celis. IMSS Vallarta, 2000. Datos no publicados), como es el caso de insecticidas órganoclorados para el control de plagas. Este tipo de insecticidas, debido a su composición química, suelen ser muy estables, casi ante todas las condiciones en el medio ambiente y son resistentes a la descomposición completa por enzimas de los microorganismos del suelo y organismos superiores (OMS, 1982). Actualmente, se ha asociado la aparición de tumores malignos con la exposición a este tipo de agentes tóxicos, (Davis DL., y cols., 1993). Existen estudios que señalan que el riesgo de desarrollar cáncer de mama está en relación con la exposición persistente a plaguicidas órganoclorados, donde se incluye al diclorodifeniltricloroetano (DDT) y los policlorinados bifeniles (PCB's), estos químicos son carcinógenos en animales de laboratorio, tienden a depositarse en tejido graso, solubles en grasa y pueden residir en el organismo hasta 728 semanas (Gammon y Wolff, 1997). Otras investigaciones indican una relación entre los niveles elevados de DDE en sangre con el incremento de cáncer de mama, estos niveles fueron determinados y medidos en mujeres con cáncer (Hunter y cols., 1997).

Por ello es que se realizó un estudio experimental con ratas hembra, expuestas de una manera controlada a DDT, mediante la ruta inhalatoria con 8 hrs. de exposición diaria, 6 días a la semana durante cinco meses, con el fin de caracterizar los efectos que dicho contaminante ocasiona en el organismo, tanto en el ámbito celular como metabólico (biomarcadores), que contribuyen de manera significativa a la génesis del carcinoma de glándula mamaria y de ese modo, recomendar dichos biomarcadores, como prácticas de rutina, con el fin de realizar una detección oportuna del proceso patológico, lo que se pueda traducir en una disminución de la incidencia del cáncer de mama.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

El número de biomarcadores disponibles para evaluar riesgo genético y de cáncer es muy extenso. La utilidad de ellos para biomonitoreo se establece por el ya conocido paradigma de cáncer inducido ambientalmente, el cual representa el punto final para asentar el espectro de interacciones genotóxicas-humanas (Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987).

En varios estudios se ha demostrado que los contaminantes ambientales, de manera particular en grandes ciudades, poseen un poder dañino sobre la salud de la población. Esto es importante ya que una población expuesta a contaminantes ambientales puede manifestar daños que repercutirán en el posible incremento de enfermedades genéticas y carcinogénesis (Binkova y cols., 1998).

La identificación oportuna de los efectos de los contaminantes ambientales sobre la salud de la población es una herramienta que permite, entre otras cosas, la elaboración de nuevos programas y evaluación de los ya existentes, para el control de la contaminación a fin de reducir la exposición y sobre todo el riesgo de desarrollar enfermedades como es el caso del cáncer (Calderon-Garcidueñas y cols., 1997).

En un grupo de trabajadores de hornos expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) carcinógenos, a una concentración de 0.6 a 547 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y a Benzo[a]pireno (B[a]P), a una concentración de 2 a 62.107 ng/m^3 , respectivamente, se observó una correlación positiva entre aductos de ADN en células sanguíneas y HAP carcinógenos y/o B[a]P en el aire inhalado y los niveles individuales (Binkova y cols., 1998). Una relación similar fue igualmente observada en el grupo muestreado por Kalina y cols. (1998), analizaron

aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y células con alta frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (AFC's).

Un análisis de aductos aromáticos de ADN en trabajadores de la fundición comparados con los controles demostraron que el método de Postmarcaje con fósforo 32 (^{32}P), es eficiente para detectar un incremento de aductos de ADN en leucocitos con exposición a B[a]P a una concentración de 5 ng/m^3 en aire (Hemminki y cols., 1997).

Jóvenes trabajadores de un taller de reparación de locomotoras expuestos a HAP provenientes de los escapes de los motores y de aceite de motor, fueron examinados mediante los ensayos de ICH y frecuencia de Micronúcleos (MN) y se encontraron altos los valores para los dos ensayos en los sujetos expuestos, (Karahalil y cols., 1999).

En trabajadores empleados en la pavimentación de caminos expuestos a humos, constituidos principalmente por HAP y sus derivados, la exposición fue evaluada por excreción de 1-hidroxipireno (1-OH-pireno) en la orina, donde se observaron los siguientes niveles $0.78 \pm 0.46 \text{ } \mu\text{mol/mol}$ en trabajadores expuestos, contra $0.52 \pm 0.44 \text{ } \mu\text{mol/mol}$ en los controles. Asimismo la exposición a humos espesos aumentó significativamente los valores de ICH y MN en trabajadores expuestos, comparados con los controles (Burgaz, S. y cols., 1998).

La genotoxicidad de bajos niveles de hidrocarburos derivados de combustibles de jet se estudió en trabajadores de un aeropuerto. Los niveles de benceno, tolueno y xileno en el aeropuerto fueron aproximadamente una décima parte, en comparación con los niveles que se encontraron en los trabajadores de las estaciones de petróleo. Se realizó un análisis de ICH, MN y parámetros del ensayo del cometa, donde no se encontró efecto en la exposición a bajas dosis de hidrocarburos mediante estas pruebas (Pitarque, M. y cols., 1999).

En un análisis de los efectos de humos de los escapes de vehículos sobre los mecánicos de motor, policías de tránsito y motociclistas, con el estudio de

empleados de oficina como control. Se determinó la exposición a compuestos orgánicos volátiles (COV) y se observó un incremento en MN, cuando el total de COV fue tasada en 363 ppb en el grupo expuesto, contra 138 ppb en los controles (Parry y cols., 1997).

En un estudio en trabajadores expuestos ambientalmente a contaminantes de un sitio de depósito de desechos, se usó una prueba citogenética y el ensayo del cometa, donde se observó un incremento de AC y en los parámetros del ensayo del cometa, pero no de ICH; Se especuló que la exposición fue a varios hidrocarburos (Hartman y cols., 1998).

Los despachadores de las estaciones de gasolina representan un grupo de personas expuestas a benceno; Carere y cols., (1998) al emplear hibridación in-situ fluorescente (FISH), con pruebas centroméricas de los cromosomas 7,11, 18 y X, observaron una hiperploidía no relacionada con la exposición o formación de MN para un grupo expuesto a concentraciones de benceno de $0.32 \text{ mg} / \text{m}^3$. Al aplicar el ensayo del cometa, Andreoli y cols (1997) encontraron que los valores del momento de la cola fueron significativamente altos en el grupo expuesto, comparados con el grupo no expuesto. Bukvic y cols., (1998), no encontraron efectos sobre ICH o HFC's, por exposición a benceno a concentraciones de $0.23 \text{ mg}/\text{m}^3$. Solamente se observó un incremento en la frecuencia de MN, relacionado con la exposición.

Surrallés y cols., (1997), al emplear FISH y cuantificación de MN en linfocitos y células de mucosa bucal, así como anomalías numéricas del cromosoma 9 en células bucales en una población ocupacionalmente expuesta a aproximadamente $3.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ de benceno en una planta petroquímica de Estonia no se encontró incremento en la frecuencia total de MN o anomalías numéricas del cromosoma 9; ésto detectado en cada célula bucal o linfocito.

Otro grupo estudiado, ha sido el de los agricultores expuestos a mezcla de pesticidas. Au y cols., (1999) analizaron las diferencias de agricultores y

controles donde no se observó incremento en AC y FISH. Lebailly y cols., (1998) con el empleo del ensayo del cometa, observaron efectos de pesticidas sobre algunos grupos de personas aplicadoras. El daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) de leucocitos fue analizado al inicio, durante y al final de los periodos de intensa actividad de aplicación de la mezcla de plaguicidas. El daño genético fue significativamente diferente entre ambos grupos, cuando los leucocitos de agricultores fueron analizados después de un día de aplicación, un efecto significativo en cuanto a daño genético se refiere, con el empleo de la prueba del cometa, se observó solamente en sujetos expuestos al fungicida Chlorothalonil.

Trabajadores de un invernadero expuestos a mezcla de plaguicidas y con una historia de trabajo de un tiempo prolongado de aplicación, fueron detectados con alta frecuencia de MN comparados con los controles (Falck y cols., 1999). En fabricas de fertilizantes fosfatados, los trabajadores están expuestos a compuestos fosfatados. Un análisis arrojó una alta frecuencia de AC y MN, en los trabajadores expuestos comparados con los controles (Meng y cols. , 1997).

Autrup y cols., (1999) recomendaron el uso del análisis de daño oxidativo como biomarcador de exposición a contaminantes del aire causado predominantemente por partículas de escapes de motores diesel. En otro estudio, choferes de autobuses y trabajadores postales, fueron monitoreados personalmente para evaluar la exposición a naftaleno en el aire inhalado, mediante la determinación de AC en linfocitos periféricos; Los resultados arrojaron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados (Hansen y cols. , 1998).

En otro estudio sobre choferes de autobuses, el daño oxidativo fue determinado por excreción urinaria de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OhdG). Se realizó una comparación de los choferes de la zona centro, en el área rural y áreas suburbanas de la ciudad de Copenhague; se encontraron diferencias significativas en la excreción de 8-OhdG; este incremento en la excreción de 8-

oxidG indica que la exposición a contaminantes ambientales puede causar daño oxidativo al ADN (Loft y cols. , 1999).

En la Ciudad de México, el problema específico de la contaminación de aire está relacionado con la exposición a una compleja mezcla de contaminantes, compuesta principalmente por altos niveles de ozono (Calderon-Garcidueñas y cols.,1999). Estos autores examinaron el daño al ADN de células del epitelio respiratorio nasal en niños. Las células epiteliales fueron analizadas con la prueba de 8-OhdG y los parámetros del ensayo del cometa. Se observó un incremento significativo de rompimiento de hebras simples, así como en los niveles de 8-OhdG, en los niños expuestos comparados con los controles. La combinación de 8-OhdG y los parámetros del ensayo del cometa son comúnmente usados para el monitoreo de daño oxidativo al ADN en poblaciones expuestas a contaminación del aire. Con el empleo del ensayo del cometa, Valdeverde y cols. (1997) analizaron el daño al ADN en leucocitos y células del epitelio nasal y bucal en muestras de jóvenes adultos de la Ciudad de México, el incremento de la longitud en la cola del cometa fue observada en leucocitos y células del epitelio nasal en jóvenes adultos de la parte sur de la ciudad, los cuales estuvieron expuestos a altos niveles de ozono, comparados con jóvenes adultos de la parte norte, que estuvieron expuestos principalmente a hidrocarburos y partículas. Esas diferencias no se encontraron en células del epitelio bucal.

La acción genotóxica de los agentes contaminantes repercute de manera directa en la salud del ser humano al ocasionar alteraciones en el material genético que pueden manifestarse en el mismo individuo, como en el caso del proceso de desarrollo de tumores, conocido como carcinogénesis. Una de las consecuencias más graves de los contaminantes, debida a su capacidad genotóxica, es el desarrollo de tumores malignos. La mayoría de este tipo de tumores resultan de la interacción de factores genéticos y medioambientales. De todos los cánceres sólo se explican alrededor del 5% por causas genéticas; el resto puede ser atribuido a causas externas "medioambientales", que actúan

en conjunto con factores genéticos y susceptibilidad adquirida (Alvarez-Moya, 2000).

El monitoreo genético de poblaciones humanas expuestas a mutágenos/carcinógenos ambientales puede llevarse a cabo por medio de diferentes biomarcadores (Hartmann y cols. 1998). Índices citogenéticos como la cuantificación de micronúcleos (MN) y el ensayo de electroforesis de célula única (ensayo del cometa), han sido extensamente utilizados en el pasado, y se están convirtiendo en los parámetros de mayor validez para detectar efectos genéticos tempranos.

El término de **biomarcador** es usado para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente ambiental, el cual puede ser químico, físico o biológico. El biomarcador puede ser usado en la identificación de una asociación causal o para hacer una estimación de esa relación y los niveles de exposición (WHO/IPCS. 1993). Los marcadores biológicos también son de utilidad para la identificación de grupos de individuos susceptibles o que están en riesgo por exposición a ciertos tipos de agentes a los que están expuestos por causas laborales o en el ambiente (Vainio, 1995).

Los biomarcadores incluyen detección de la sustancia ambiental propia o sus metabolitos en orina o sangre, cambios en el metabolismo, cambios en el material genético y en la estructura celular o muerte celular. Los eventos biológicos detectados pueden representar variación en el número, estructura o función celular, así como en sus componentes bioquímicos (Van Damme, 1995).

Existen marcadores biológicos de tipo bioquímico los cuales pueden indicar las respuestas de un organismo ante la acción de sustancias químicas ambientales y que pueden reflejar la magnitud del daño (Walker, 1992).

Asimismo, existen los marcadores genéticos que son útiles para medir el daño que provocan algunas sustancias genotóxicas sobre el material genético, entre ellas se tienen el ensayo del Cometa y la formación de aductos de ADN, entre



otros; este tipo de técnicas son una poderosa herramienta para la medición de la dosis biológicamente efectiva de los contaminantes ambientales (Walker, 1992., Sabbioni y Neumann, 1990).

La determinación de AC en cultivo de linfocitos es un método establecido de monitoreo de poblaciones expuestas laboral o ambientalmente a agentes carcinógenos o mutágenos conocidos o sospechados (Forni, 1984) (fig. 1).

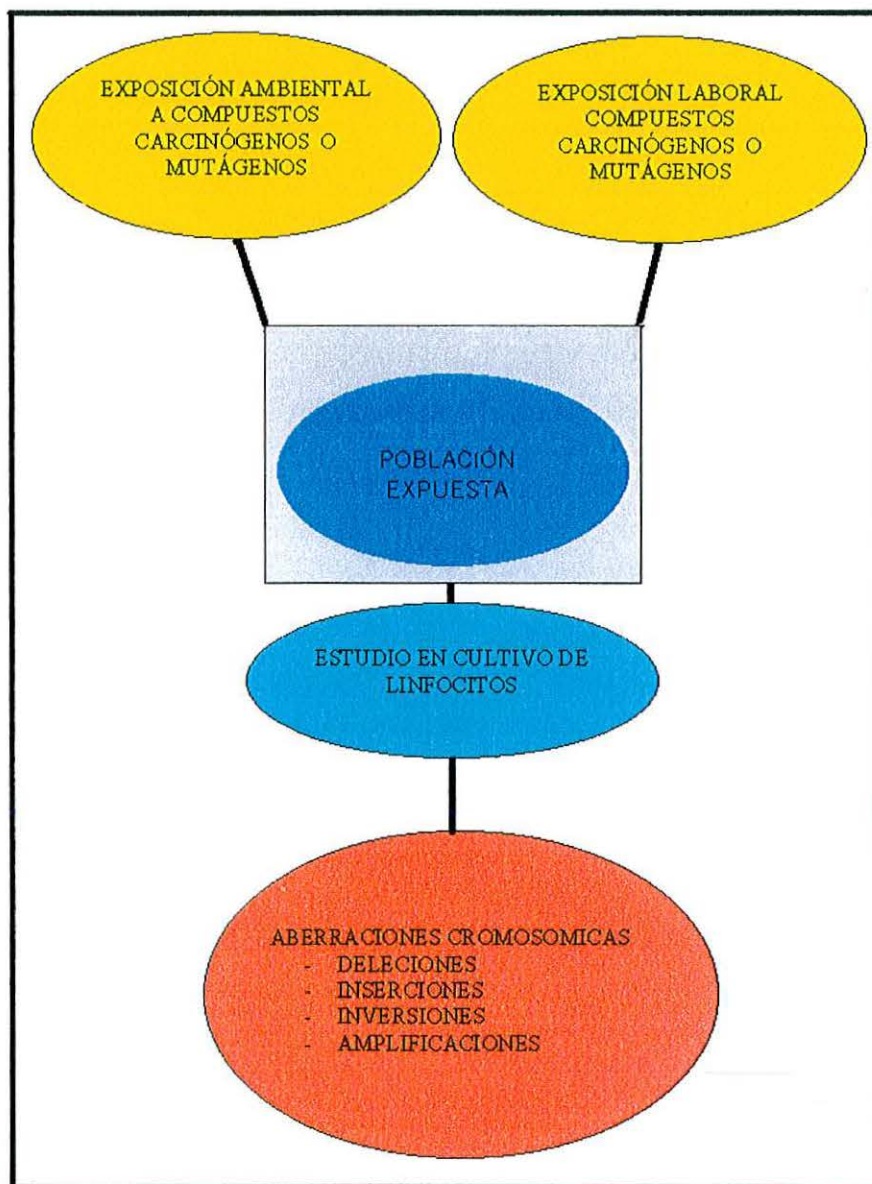


Fig 1. Monitoreo de poblaciones expuestas a contaminantes ambientales (Canales-Aguirre y cols., 2002).

Citogenéticamente el daño puede ser visible en cromosomas humanos por intercambio de cromátides hermanas (ICH) o células micronucleadas (MN), (Sorsa, 1984).

2.2. FACTORES DE RIESGO EN CÁNCER DE MAMA

2.2.1 Factores genéticos

Gail y Benichou, (1994), señalan que aproximadamente el 5% de las mujeres con cáncer de mama pueden tener mutaciones de línea germinativa, como en el gen BRCA-1, localizado en el cromosoma 17q21 (fig 2). La evidencia de que un solo gen tiene efectos opuestos sobre el crecimiento de células malignas es cuestionable ya que depende del estado de expresión del receptor, de esta forma nace la pregunta ¿son los tumores de mama con o sin expresión del receptor, dos entidades diferentes? (Wang, 1995).

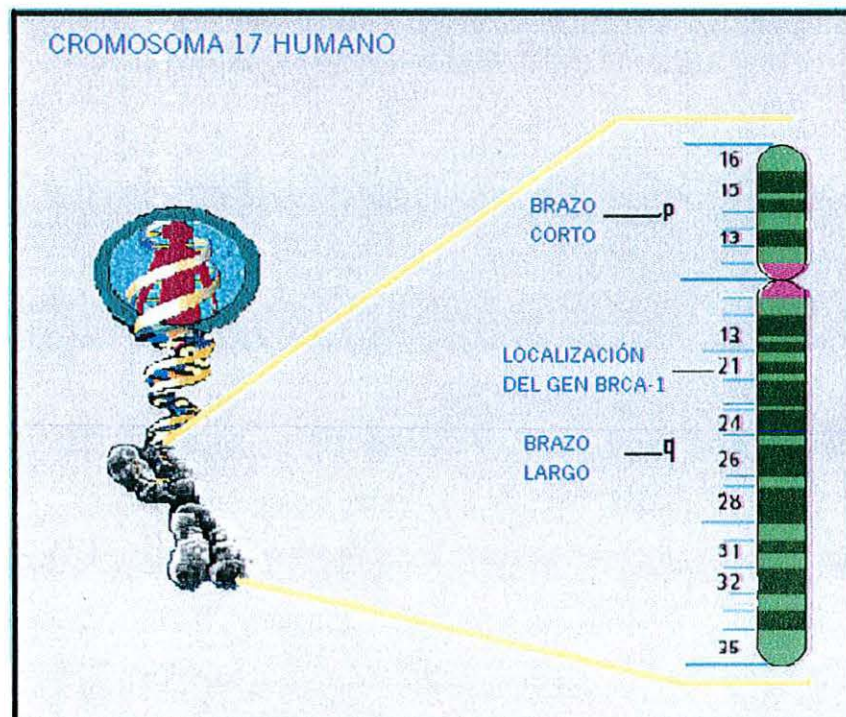


Fig 2. Localización del gen BRCA-1 en el cromosoma 17 (Modificado de Genes Vii/ilustration 2001).

Loman en 1998, señala que es útil para el diagnóstico conocer los genes BRCA-1 y BRCA-2, ya que son distintos en su expresión en el problema del cáncer. Otro hecho que reporta Loman es que el tumor primario rara vez responde al tratamiento con Tamoxifen, la relación es del 10 % entre los casos de receptor de estrógenos (RE) positivos; estos resultados están asociados con tumores bien diferenciados y es útil como marcador diagnóstico.

El BRCA-2 se localiza en el cromosoma 13q12-13 y se le relaciona con un alto riesgo en el cáncer de mama (Wooster, 1994). Los genes BRCA1 Y BRCA2 son útiles en la reparación del ADN, el antecedente familiar de cáncer de mama constituye un factor de riesgo para el carcinoma, no obstante persiste la falta de certeza (Wooster, 1994).

Hampton y Maher en 1998, señalan que existe una predisposición genética en el desarrollo de cáncer de mama, él observó que en familias de primer grado existen mutaciones de línea germinal en el gen supresor de tumor P53, actualmente se persigue la base genética al realizar la historia familiar y el reporte de casos de cáncer de mama. Investigaciones epidemiológicas actuales muestran la importancia que tiene la relación del inicio del tumor, el desarrollo y su malignización, con los genes como factores de riesgo, así como con la muerte celular programada (apoptosis) responsables de los cambios de la célula en la multiplicación acelerada y desorganizada, en el momento de su malignización (Elledge, 1994).

2.2.2 Factores hormonales endógenos

Los factores endógenos están dados por la acción de los estrógenos y la progesterona, que se miden en sangre para realizar un diagnóstico de cáncer de mama. Estudios recientes reportan a los receptores de estrógenos y progesterona elevados en este padecimiento. En la síntesis y regulación del receptor de estrógenos donde, se presentó un aumento en los niveles de proteínas, se presenta una diferencia en estrógenos y receptor de progesterona

en pacientes pre y postmenopáusicas y en las diferentes clases de tumores se les ha encontrado una semejanza con las hormonas estrógenicas ambientales (Pujol, 1998).

Tanto los factores hormonales como los genéticos y ambientales participan en la carcinogénesis en mama. Una amplia variedad de contaminantes ambientales tienen la habilidad de mimetizar las acciones de las hormonas esteroides en el cuerpo (Davis, 1997). Los químicos que pueden mimetizar las acciones de los estrógenos se denominan "estrógenos ambientales" o "xenoestrógenos" (Canales-Aguirre y cols., 2002). Estos contaminantes interfieren en procesos importantes ya que actúan como reguladores estrógenicos, por lo que se convierten en factores de riesgo. Aunque existen acuerdos sobre el papel de los xenoestrógenos en el desarrollo del cáncer, existen pocos datos que apoyen esta hipótesis (Muss, 1998). Por otra parte las hormonas estrógenicas tienen una fuerte influencia en la tasa de mitosis del epitelio mamario y utero, cuyas respuestas hormonales son mediadas por el receptor de estrógenos. El mecanismo por el cual los estrógenos afectan la proliferación de las células blanco no está totalmente comprendido, varias líneas de investigación indican que los estrógenos pueden inducir una expresión de un ciclo regulador de genes directamente, lo que sugiere un papel primario para el RE en el ciclo regulador de progresión celular (Muss, 1998).

Asimismo algunos estrógenos naturales o sintéticos pueden inducir en roedores, tumores mamarios, en hipófisis, cervico-uterinos o renales (Tsutsui y cols. , 1997). La capacidad del estradiol y algunos de los diferentes metabolitos de estradiol para inducir la transformación celular, incluso su metabolismo, es similar en ratas y en humanos (Tsutsui y cols. , 1997). El estradiol es oxidado inicialmente a estrona, seguido de hidroxilaciones en las posiciones C2 y 16 α , que son mutuamente excluyentes. Los principales productos de la 16 α -hidroxilación, son la 16 α -hidroxiestrona (16 α -OHE) y el estriol. La 2-hidroxilación produce el catecol estrógeno 2-hidroxiestrona (2-OHE). Tanto el estradiol, como la estrona, 16 α -OHE, 2-OHE, son capaces de inducir

transformación morfológica en células de embrión de hámster que son tratadas con estos metabolitos de estrógeno, y esta transformación se observa de manera dosis-dependiente (Tsutsui y cols., 1997). Incluso, se ha identificado una mayor actividad de transformación morfológica en células tratadas con 16α -OHE o con 2-OHE, que con los otros tipos de estrógeno. De hecho, se considera que la 16α -OHE es capaz de inducir síntesis desprogramada de ADN y crecimiento independiente y anacrónico de células epiteliales de tejido mamario de ratón (Telang y cols., 1992). Adicionalmente, la 16α -OHE se puede unir covalentemente, no sólo a nucleohistonas "in vitro", también se puede unir a proteínas nucleares reguladoras, específicamente con receptores a estrógenos, en células blanco de estrógenos (Swanek y cols., 1988); ésto puede alterar la función génica, participando posiblemente en el proceso de transformación. Se han podido detectar niveles elevados de 16α -OH E1 en tejido mamario de mujeres con cáncer de mama (Schneider y cols., 1982) y en ratones que tienen una alta incidencia de formación de tumores mamarios (Telang y cols., 1992).

2.2.3 Factores hormonales exógenos

Existen numerosas evidencias de la capacidad de los agentes xenobióticos para incrementar la síntesis de estrógenos, debido a que se acoplan al sitio activo del receptor a estrógenos y promueven la síntesis de estradiol endógeno, por lo que genéricamente son denominados xenoestrógenos (Colborn y Clement, 1992). Los xenoestrógenos incluyen algunos componentes lipofílicos persistentes a los cuales, tanto los humanos como las especies de vida silvestre han estado expuestos, entre esos químicos sintéticos se tienen algunos insecticidas orgánicos clorados, policlorados bifenilos, y más recientemente algunos componentes no clorados usados como antioxidantes, así como algunos materiales plásticos (Sonnenschein y cols., 1995. Krishnan y cols., 1993).

2.3 CÁNCER DE MAMA Y MEDIO AMBIENTE

El cáncer de mama es una enfermedad de enorme importancia en salud pública. De acuerdo con la Agencia para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de Salud, el cáncer de mama es la segunda forma de cáncer más común en mujeres del mundo moderno sólo superado por el cáncer cérvico uterino. Los registros de casos nuevos en naciones industrializadas son relativamente altos y en países en desarrollo el número se ha aumentado rápidamente (Parkin y cols., 1992).

Por mas de tres décadas, los científicos han identificado numerosos factores de riesgo que en suma se les puede atribuir el 40 % de todos los casos de cáncer de mama. Entre los **factores de riesgo** establecidos para esta enfermedad se pueden mencionar: primera menstruación antes de los 12 años de edad, así como última menstruación después de los 53 años de edad, el no procrear hijos, no amamantar a los hijos, exposición temprana y repetida a dosis relativamente alta de radiación, obesidad después de la menopausia, así como la historia familiar de la ocurrencia de cáncer de mama (Madigan y cols., 1995).

Otros factores que supuestamente aumentan el riesgo, aunque los datos no son muy claros son: ingesta diaria de alcohol, falta de ejercicio vigoroso, dieta baja en vitamina D y fibra, ser fumador activo o pasivo y exposición a agentes químicos (Davis, 1999).

La evidencia de que factores ambientales tienen un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama deriva de las observaciones de considerables variaciones geográficas en los casos de cáncer de mama entre grupos étnicos. Estudios han demostrado que mujeres Asiáticas que viven en Estados Unidos tienen altos registros de cáncer de mama comparados con mujeres que viven en sus lugares de origen (Ziegler y cols., 1993).

Existe evidencia de que la exposición acumulativa a estrógenos tiene un papel importante en el incremento del riesgo del desarrollo de la enfermedad. Las mujeres que aumentan la exposición a estrógenos durante el curso de su vida,

aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, por ejemplo mujeres que empiezan su menstruación a edades tempranas y entran a la menopausia a edades tardías, son más vulnerables a desarrollar esta enfermedad, que las mujeres con fases menstruales cortas durante su vida. La reducción de estrógenos por extirpación quirúrgica de ovarios puede disminuir sustancialmente el riesgo de cáncer, el amamantar a los hijos reduce la exposición a estrógenos acumulativos en la madre, asimismo disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad (Davis, 1999), a pesar de que están expuestas a más periodos de elevación sanguínea de prolactina. Además, mujeres que padecieron toxemia en el embarazo, tienen bajos niveles hormonales, por lo que se ha sugerido que sus hijas tienen reducido su riesgo de desarrollar cáncer de mama, debido posiblemente a que sus células mamarias estuvieron expuestas prenatalmente a bajos niveles de hormonas circulantes (Ekbom y cols., 1997).

La evidencia de que las hormonas naturales tienen un papel importante en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, abre la hipótesis de que las hormonas sintéticas juegan un papel similar. Durante las pasadas tres décadas, algunas de las líneas de evidencia han convergido en la idea de que un gran número de compuestos comúnmente usados pueden modificar o mimetizar la acción de los estrógenos naturales; algunos de esos compuestos que mimetizan hormonas pueden ser benéficos, como los que se encuentran generalmente en plantas y peces. En contraste, otros compuestos que de igual forma mimetizan la acción de las hormonas parecen ser generalmente dañinos, como es el caso de aquellos compuestos encontrados en pesticidas, plásticos y combustibles. Estudios llevados a cabo en modelos experimentales, en especies silvestres y algunos otros en humanos han encontrado niveles altos de algunos de estos compuestos dañinos en organismos con el sistema hormonal alterado u otros problemas los cuales incluyen defectos en el comportamiento y en el desarrollo. (Colborn y cols., 1996).

Así mismo existe la teoría de que varios de esos xenoestrógenos sintéticos pueden incrementar el riesgo de cáncer de mama por afectación inversa del metabolismo estrogénico; de igual forma otros xenoestrógenos de plantas como el soya pueden proteger contra la enfermedad (Davis, 1999). El estrógeno natural y el xenoestrógeno pueden dar principio al cáncer de mama a través de algún mecanismo ya que ambos pueden unirse al RE y alterar de esa forma, el metabolismo hormonal del organismo. El estradiol, principal estrógeno generado por la mujer, es metabolizado en el cuerpo hacia diferentes metabolitos estrogénicos que tiene efectos diferentes, ya que se generan metabolitos “benéficos” o “dañinos”. El estrógeno benéfico parece que promueve la reparación celular y previene el cáncer ya que al parecer aumenta los factores protectores en el ciclo celular que abaten el cáncer. En contraste, el estrógeno dañino parece estimular el daño que lleva al desarrollo del cáncer, al alterar la expresión de algunos factores protectores o bien la cantidad de hormonas libres circulantes, lo que puede promover el crecimiento acelerado de células mamarias (**fig 3**). Tanto el daño genético como el crecimiento acelerado pueden ser reparados (Bradlow y cols., 1995).

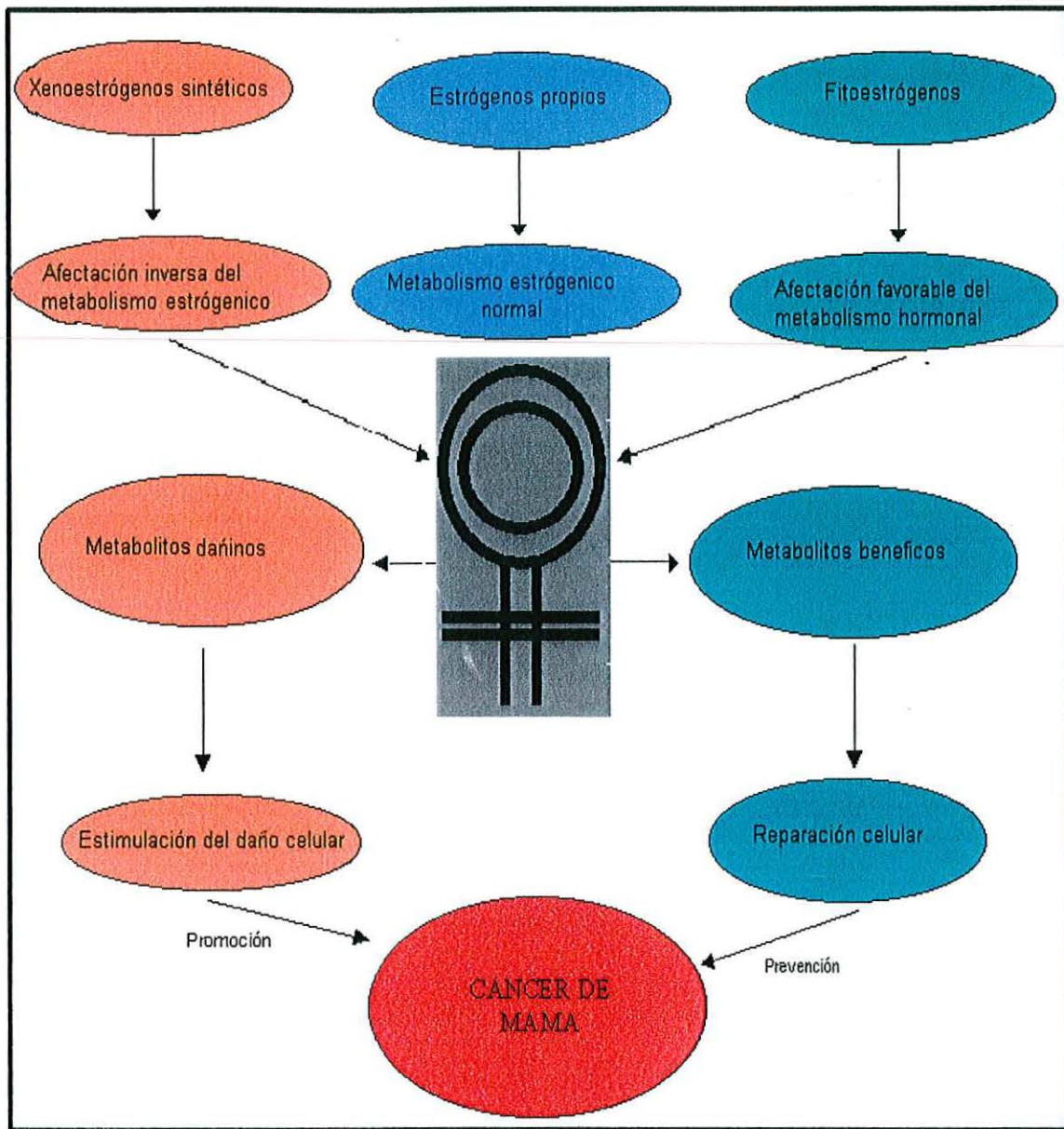


Fig 3. Efecto de los estrógenos propios y xenoestrógenos sobre el organismo (Canales-Aguirre y cols., 2002).

Se ha descrito que células cancerosas mamarias humanas tienen niveles de estrógeno dañino, cuatro veces más alto que las células normales (Davis, 1999). Cuando los pesticidas se añadieron a las células cancerosas humanas, la relación en la cantidad de estrógeno no dañino y dañino cambió significativamente (Krieger y cols., 1994). Dichos pesticidas tienden a acumularse en células grasas y pueden, de alguna manera, influenciar la formación de diferentes metabolitos estrógenicos. Esta evidencia da principio a

la teoría de que la exposición a ciertos xenoestrógenos presentes en el ambiente pueden incrementar la relación de estrógeno “bueno” y “malo” en el tejido mamario. Algunos estudios conducidos en los 70’s y 80’s encontraron que mujeres con altos niveles de metabolitos de DDT en sangre, tienen elevado el riesgo de padecer cáncer de mama (Davis, 1999). Sin embargo, otros autores han puesto en duda esta asociación (Hunter y cols., 1997).

La información acerca del poder dañino de los xenoestrógenos, como puede ser el caso de algunos pesticidas organoclorados de larga vida, provee uno de los mayores retos de la investigación epidemiológica. En parte, porque existen otros factores que contribuyen, tanto en forma positiva, como negativa y que no pueden ser fácilmente medidos, pero que son de gran importancia. Por el momento algunas rutas para la generación de estrógeno dañino podrían incluir la exposición que ocurre en las dos primeras décadas de la vida, donde es común el uso de materiales como: plástico, combustibles o productos farmacéuticos de los cuales ninguno puede ser detectado fácilmente, ya que no se acumulan en el tejido adiposo (Davis, 1999).

2.4 TEORÍA BÁSICA PARA LA FORMACIÓN DE CÁNCER DE MAMA

Se ha documentado que existen compuestos que funcionan como xenoestrógenos, que pueden afectar la relación y tipos de metabolitos de estradiol formados. Los xenoestrógenos pueden unirse directamente con el RE y modular la proliferación de células mamarias y de esa forma influenciar el desarrollo de cáncer de mama y otras enfermedades mediadas hormonalmente (Aldercreutz y cols. 1994, Davis y cols., 1993). Así mismo se han estudiado las posibles interacciones genes-hormonas-ambiente, en donde se incluyen las complejas relaciones entre estrógenos, andrógenos, sus antagonistas y otras hormonas que pueden llevar al desarrollo de cáncer de mama (Davis y cols., 1997, Harris y cols., 1992, Pike y cols., 1993).

La exposición prenatal, durante la adolescencia y durante la vida media de un individuo a agentes endócrinos endógenos, xenohormonas y sus metabolitos pueden tener un efecto bifuncional sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Pike y cols.,1993, Aldercreutz y cols., 1994, Davis y cols. 1993, Fishman y cols, 1995).

De igual forma existe la hipótesis de que la exposición a xenoestrógenos puede, a través de un ciclo de reducción entre estrógenos y sus correspondientes quinonas, originar especies de oxígeno reducido que pueden ocasionar daño oxidativo estructural al ADN e incrementar la tasa de modificaciones sobre las bases de ADN por daño oxidativo (Liehr y cols., 1995, 1996, Dees y cols., 1997, Malins y cols. 1993). Los productos de la oxidación de lípidos pueden, de igual forma, funcionar como agentes endógenos dañinos al ADN (Ames y cols.,1995). En suma, otro tipo de funciones reactivas como son la metilación o la fosforilación, pueden afectar regiones funcionales clave del ADN, como pueden ser genes del ciclo celular críticos para la proliferación, desarrollo y crecimiento celular. La exposición a xenohormonas a través de la dieta, productos farmacéuticos o químicos ambientales pueden alterar el ambiente parénquimal, ya sea mediante la promoción de células mamarias ya iniciadas a entrar a una proliferación relativamente rápida o impidiendo su crecimiento, si las xenohormonas son antioxidantes o antiangiogénicas [inhiben la formación de vasos sanguíneos] (Davis y cols.1997).

Las xenohormonas sintéticas o las que se encuentran de manera natural, pueden afectar los procesos de transformación tumorogénica a dos niveles, genotóxica (inicialmente) o epigénicamente (post iniciacional). El centro del efecto bifuncional del E₂ biodisponible es la conversión enzimática a productos con distinta actividad biológica. El metabolito propio o su producto oxidado puede inducir directamente daño genotóxico al ADN así como modulación de oncogenes, genes supresores de tumor o depresión de genes que controlan el ciclo celular. Adicionalmente, las hormonas, sus metabolitos y las xenohormonas pueden ejercer epigénicamente, efectos paracrinos sobre

células pre-iniciadas, mediante la vía hormonal o receptor de factor de crecimiento así como vía intracelular mediante canales de comunicación. Esos efectos indirectos operan predominantemente durante los eventos promocionales de transformación carcinogénica (Davis y cols., 1997a).

Existen xenoestrógenos benéficos, como el genisten y otros bioflavonoides que se encuentran de manera natural en vegetales, frutas y productos de grano, los cuales pueden reducir los niveles de proliferación aberrante de células mamarias e inhibir la angiogénesis, así como incrementar los procesos de reparación del ADN; por otro lado, de igual forma aumenta la cito diferenciación y apoptosis. Los niveles farmacológicos de dichos compuestos operan mediante mecanismos independientes del receptor, que puede inhibir quinasas y topoisomerasas del ADN y de esa forma afectar otros blancos bioquímicos intracelulares (Dees y cols., 1997, Malins y cols., 1993).

Cerca del 15% de las mujeres a pesar de que tienen mutado el gen BRCA1, aparentemente no desarrollan cáncer de mama (Miki y cols., 1994, Hall y cols., 1990). En esos casos, las xenohormonas benéficas u otros factores exógenos pueden tener un papel positivo, ya que al parecer promueven la desintoxicación enzimática de carcinógenos potenciales, procesos de reparación de ADN o formación de antioxidantes o aumentar la habilidad de las células para anular las señales que pueden producir un crecimiento descontrolado (Davis y cols., 1997a). Algunos investigadores reportaron que el promedio de edad para el inicio de la enfermedad se ha reducido en los portadores del gen BRCA1 mutado (Miki y cols., 1994, Hall y cols., 1990).

2.5 METABOLISMO HORMONAL Y CÁNCER DE MAMA

Muchas hormonas están involucradas en el desarrollo de la glándula mamaria humana. Los estrógenos esteroideos mamotrópicos y progesterona son cruciales para la proliferación de células mamarias, así como la prolactina y glucocorticoides son para la citodiferenciación (Nandi y cols., 1995). Las

alteraciones mediadas hormonalmente en el estatus de proliferación y citodiferenciación pueden participar en la carcinogénesis (Lea y cols., 1989, MacIndoe y cols. 1981, Thomas y cols., 1982). Las complejas interacciones de influencia de las hormonas esteroideas sobre carcinogénesis mamaria, de esa forma, aun no han sido del todo aclaradas (Davis y cols., 1997b). Algunos investigadores han observado que altos niveles de estradiol biodisponible o libre, aumentan la tasa endógena de división celular de células mamarias y por lo tanto, el riesgo acumulativo de desarrollar cáncer de mama (Pike y cols.,1993).

El estradiol endógeno y la mayoría de los fitoestrógenos naturales de plantas, son metabolizadas y excretadas relativamente rápido y se unen fácilmente a la hemoglobina sérica (SHBG); por el contrario, los xenoestrógenos no parecen tener esta capacidad de unión (Rosner y cols.,1992, Aldercreutz y cols., 1992, Bradlow y cols., 1995, Nagel y cols., 1997). Mas aun, la vida media de algunos xenoestrógenos lipofílicos, como los pesticidas organoclorados pueden extenderse a algunas décadas, en contraste con la mayoría de los estrógenos naturales, los cuales son metabolizados completamente en algunos minutos u horas (Davis y cols., 1997).

Sin embargo otras teorías sugieren que existen dos rutas enzimáticas exclusivas que compiten mutuamente y que pueden alterar la producción de estradiol biodisponible. La ruta 1 que inserta un hidroxilo (-OH) en la posición C2 y da origen al estrógeno catecol 2-OHE, un metabolito débilmente estrogénico y la ruta 2 que añade un -OH en la posición C16 α - y da 16 α -OHE, metabolito con un poder estrogénico muy fuerte y que puede unirse covalentemente al receptor de estrógeno (Aldercreutz y cols., 1992, Toniolo y cols., 1995).

Otros estudios en cultivo de células epiteliales mamarias murinas han demostrado que iniciadores de carcinogénesis mamaria en ratas, aumentan la ruta 2 y disminuyen la ruta 1 (Telang 1996, Telang y cols., 1992, Suto y cols., 1993). La exposición de células epiteliales mamarias de murino a 16 α -OHE,

resulta en daño genotóxico al ADN e incrementa la proliferación celular en una forma dependiente e independiente con las condiciones de crecimiento de manera muy similar a la inducida por el tratamiento con el carcinógeno 17, 2 – Dimetilbenzo[a] antraceno (DMBA) (Nagel y cols., 1997). En contraste, la 2-OHE disminuye esas actividades y regula los efectos del DMBA (Suto y cols.,1993).

En carcinógenos iniciadores y en células derivadas de tumor la 16 α -OHE aumenta al tiempo que la 2-OHE disminuye, expresando el fenotipo transformado (Davis, 1993, Fishman y cols.,1995). Cambios similares se han reportado en explantes de mama humano y en modelo de cultivo de células (Suto y cols. 1993). Es por lo tanto concebible que el metabolismo celular del E₂, es alterado durante la carcinogénesis mamaria tanto en ratas como en humanos y que el metabolismo individual puede extenderse a diferentes efectos biológicos durante la promoción o la iniciación de la carcinogénesis mamaria (Davis y cols., 1997).

En cultivo de células de carcinoma mamario humano algunos pesticidas organoclorados activan la enzima citocromo P-450 oxidasa que es responsable de la formación de la 16 α -OHE, comparado con la producida por el rodenticida carcinógeno DMBA (Bradlow y cols., 1995).

Varios estudios indican que la 16 α -hidroxilación del E₂ tiene un papel bifuncional en el desarrollo de cáncer de mama. El receptor de estrógeno es reconocido por el factor de transcripción que puede ser el proceso central por el cual los metabolitos estrogénicos inducen cambios genómicos. Este proceso incluye la habilidad del receptor de estrógeno a unirse apropiadamente a elementos de respuesta del ADN, en donde se aumenta la activación transcripcional e inicia una cascada de eventos que involucra la expresión de algunos genes de respuesta a estrógeno como son: *Pse*, *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*, los que codifican para proteínas nucleares de regulación del crecimiento celular (Bradlow y cols., 1985). Otros metabolitos del estradiol exhiben una unión inversa al RE y algunos trabajos indican que la 16 α -OHE tiene una capacidad

única para unirse covalentemente y de forma irreversible al RE (Swanek y cols., 1988).

Las variaciones en los niveles de metabolismo del estrógeno endógeno, originan la formación de metabolitos con distinta actividad biológica, la cual puede explicar algunas variaciones geográficas y étnicas reportadas para cáncer de mama; mujeres Asiáticas, las cuales muestran bajos niveles de secreciones mamarias tienen bajos rangos de cáncer de mama y tienen asimismo, altos niveles de 2-OHE y bajos niveles de 16 α -OHE (Thomas y cols., 1982, Goldin y cols., 1988).

2.6 DAÑO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL AL ADN EN EL CÁNCER DE MAMA

Distintos procesos endógenos pueden alterar la estructura y función del ADN, incluyendo oxidación, metilación, desaminación, fosforilación y depuración. Los oncogenes han sido considerado como blancos moleculares. Su función se ha relacionado con el desarrollo de cáncer. Un arreglo de genes supresores de tumores como son BRCA1, BRCA2, Rb, DCC y p53 permiten el desarrollo de cáncer cuando sus funciones de vigilancia y reparación se pierden a través de la fosforilación u otros cambios (Miki y cols., 1994, Bradlow y cols. 1995). Por otro lado, los factores de crecimiento y receptores hormonales pueden estimular de una manera independiente, la proliferación celular o activar genes de respuesta a hormonas sin causar daño estructural al ADN (Harris y cols., 1992, Ames y cols., 1995, Telang y cols., 1992).

El metabolismo del oxígeno involucra una cadena de reducción de moléculas y la formación de radicales libres que reaccionan con el ADN y que tienen un papel pivote en el daño estructural o funcional ocasionado al ADN. La oxidación de una porción del estrógeno catecol 4-hidroxiestradiol da la formación de semiquinonas que son especies reactivas que a futuro se convierten en quinonas por oxidación. Alternativamente, las semiquinonas pueden reaccionar

y dar iones superóxido los cuales a su vez originan peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la producción de radicales libres formados de semiquinonas puede dañar directamente los enlaces fosfodiéster o alterar la secuencia nucleotídica del ADN y de esa forma dañar los procesos de transcripción normal (Liehr y cols., 1996, Weisz y cols., 1992, Han y cols., 1995, Li y cols., 1990).

Los radicales libres inducen daño y de igual forma pueden causar pérdida en la función de genes supresores de tumores, disminución de células NK, debilitar los procesos de desintoxicación enzimática o alterar la síntesis de factores de crecimiento (Weisz y cols., 1992, Han y cols., 1995, Li y cols., 1990).

Algunos investigadores han demostrado que los radicales hidroxilo (-OH) y los metabolitos oxidados de hidrocarburos aromáticos pueden modificar de forma específica e irreparable la estructura del ADN y de ese modo iniciar la mutagénesis o carcinogénesis (Li y cols., 1996). Distintos tipos de -OH inducen modificaciones en las bases del ADN; estas modificaciones han sido determinadas en mujeres con cáncer de mama y en aquellas con riesgo de desarrollar dicho mal (Malins, 1993).

Existe evidencia de que la relevancia del daño oxidativo al ADN en cáncer de mama está dada predominantemente por la generación de $H_2 O_2$, que puede atravesar la membrana nuclear, donde es convertido por catálisis de hierro o cobre en radicales libres de -OH. Algunos xenoestrógenos y metabolitos de estrógeno pueden promover la producción de radicales libres mediante la reducción del ciclo del $H_2 O_2$, mediado por las enzimas citocromo P-450 oxidasa y reductasa que originan especies de oxígeno reactivo que dañan al ADN (Liehr y cols., 1995, 1996).

Otra ruta crítica para desarrollo de cáncer de mama puede surgir de agentes que afectan genes de proteínas reguladoras como son la fosfatidilinositol-3-cinasa, estas proteínas son esenciales para detectar el daño al ADN (Davis y cols., 1997).

2.7 PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son el nombre genérico que recibe cualquier sustancia o mezcla de sustancias que es usada para controlar las plagas que atacan los cultivos o los insectos que son vectores de enfermedades. Los plaguicidas químicos sintéticos, son el resultado de un proceso industrial de síntesis química y se han convertido en la forma dominante del combate a las plagas, después de la segunda guerra mundial, gracias al desarrollo de la Industria química y al tipo de agricultura dependiente de estos insumos (Ortiz-Hernández, y cols., 1997).

Esta definición incluye los materiales agrícolas de consumo, madera y sus derivados, forraje para animales o productos que puedan administrárseles para el control de insectos, arácnidos y/o diferentes plagas corporales. (Anwar, 1997).

La historia de los plaguicidas se puede resumir y dividir en tres grandes etapas: la primera a principios del siglo XIX, cuando se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de algunos elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico, piretrinas y fósforo; asimismo se inició el uso de los derivados del petróleo. La segunda etapa en 1922, cuando se emplearon diferentes aceites insecticidas y poco más tarde los primeros productos sintéticos. La tercera etapa, en la que Müller, en 1940 descubre las propiedades insecticidas del DDT (Harte, 1995).

Desde entonces, se han producido potentes venenos contra los diferentes organismos plaga, siendo la mayoría organoclorados (su principal característica es que poseen átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones, oxígeno y son muy estables en el ambiente) y organofosforados, derivados del ácido fosfórico. Poseen un átomo central de fósforo en la molécula. Son los más tóxicos y menos estables en el ambiente en relación con los organoclorados- (Cremllyn, 1979).

Sin embargo, el uso intensivo de estos compuestos empezó a producir enormes problemas de contaminación ambiental y daños a la salud, tal es el caso del DDT que se desarrolló como el más conocido entre los organoclorados y fue usado extensivamente para el control de plagas hasta su prohibición en 1979. Sus metabolitos (productos secundarios de su degradación) se han encontrado contaminando el suelo y el agua, así como en tejidos animales y en humanos. Otros ejemplos de este tipo de plaguicidas son el Dieldrin, Heptaclor, Benzeno, Clordano, entre otros, los cuales han causado también una grave contaminación de los ecosistemas (OMS, 1982).

Estos componentes producen susceptibilidad a la toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad y este hecho ha levantado un interés público por la salud. Esto ha llevado al desarrollo de otros plaguicidas "menos tóxicos" como son carbamatos (estructura química basada en un alcaloide de la planta *Physostigma venenosum*) y componentes organofosforados. Estos últimos se empezaron a sintetizar en 1948. Los nuevos compuestos desarrollados han reemplazado gradualmente a la mayoría de los plaguicidas clorados. En el presente, los carbamatos y organofosforados son los ingredientes activos de la mayoría de los insecticidas y algunos de los herbicidas en uso (Chapalamadugu y Chaudhry, 1992).

Cuando los plaguicidas ingresan en las cadenas alimentarias se distribuyen a través de ellas, se concentran en cada nicho ecológico y se acumulan sucesivamente hasta que alcanzan una concentración letal para algún organismo constituyente de la cadena, o bien hasta que llegan a niveles superiores de la red trófica (Campbell, 1987) (**fig. 4**).

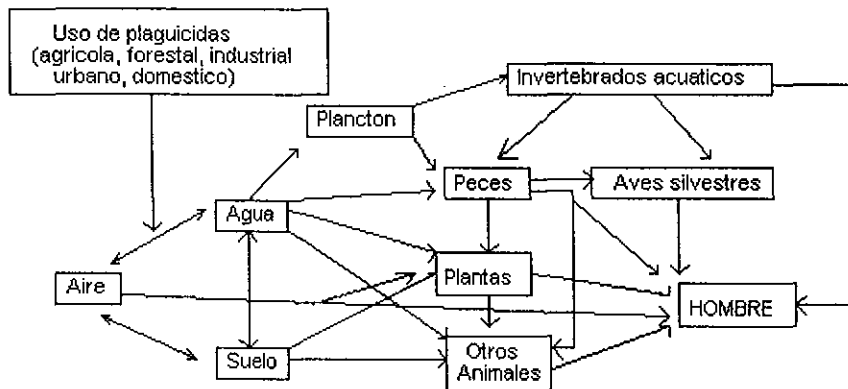


Fig. 4. Introducción de los plaguicidas a la cadena alimentaria (Monterrosas, 1998).

La contaminación del ambiente por plaguicidas se da por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados y dispuestos en el suelo. Los restos de estos plaguicidas se dispersan en el ambiente y se convierten en contaminantes para los sistemas biótico (animales y plantas principalmente) y abiótico (suelo, aire y agua) amenazando su estabilidad y representando un peligro de salud pública (Ortiz-Hernández, y cols., 1997).

Lo anterior también es decisivo para determinar la distribución del material en la biósfera, ya que las plantas y los microorganismos no pueden recibir directamente los compuestos adsorbidos sobre las partículas del suelo. Este proceso está en equilibrio con la eliminación (desorción) del compuesto en la solución del suelo. La distribución de un plaguicida en la biofase (plantas y microorganismos) depende de la capacidad de absorción de esta y de la naturaleza del suelo. Un suelo con gran capacidad de absorción puede conducir a la inactividad total del plaguicida, ya que nunca penetrara en la plaga **fig. 5** (Cremlyn, 1990).

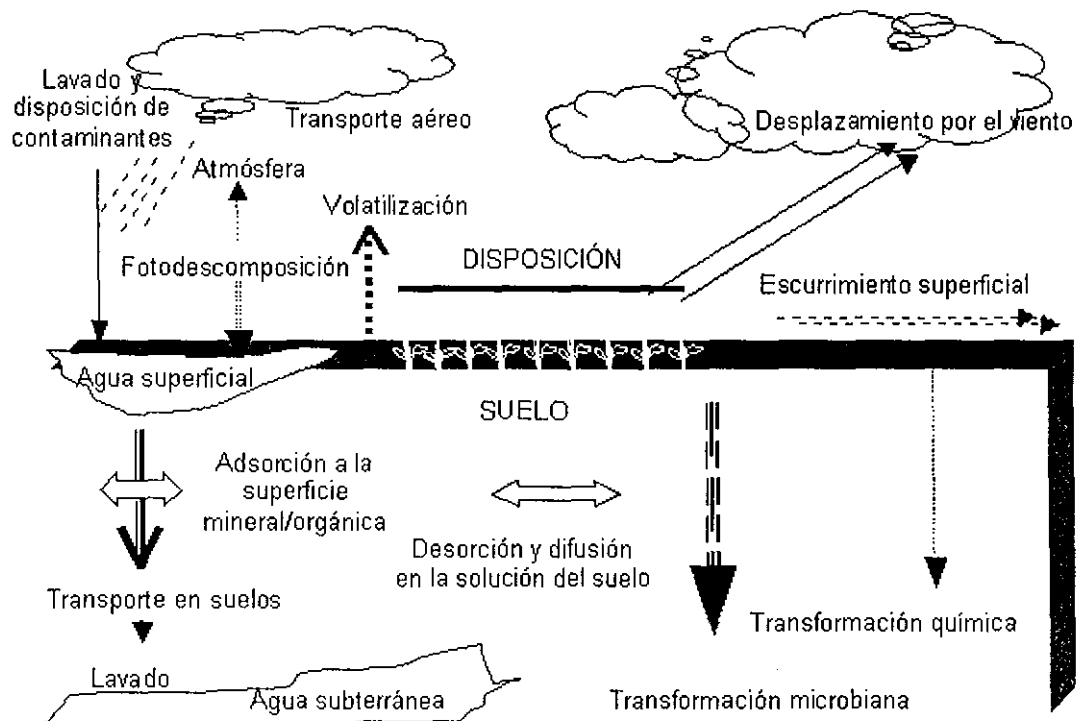


Fig. 5 Dinámica de los plaguicidas en la biosfera (Cremlyn, 1990).

Algunos plaguicidas son cancerígenos, pero todos causan lesiones degenerativas en hígado y riñón, son estimulantes del sistema nervioso central, y provocan reacciones tóxicas como vómito, dolor de cabeza, conjuntivitis, diarrea, calambres abdominales, dificultad para respirar, entre otros (Ortega y cols., 1994).

2.7.1 Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican en una gran variedad de formas: según los organismos que controlan su concentración, modo de acción, composición química, según la presentación de sus formulaciones comerciales y según el uso al que se destinan; sin embargo, es conveniente recordar que por definición, todos los plaguicidas son sustancias tóxicas, diseñadas para interferir o modificar mecanismos fisiológicos fundamentales de los insectos, que también son compartidos por otros animales incluido el hombre, y que en determinadas circunstancias pueden provocarle la muerte (WHO, 1975).

Se clasifican según los organismos que controlan en:

Insecticidas: cuando controlan insectos.

Fungicidas: cuando controlan hongos.

Herbicidas: cuando controlan plantas o arbustos.

Acaricidas: cuando controlan ácaros.

Rodenticidas: cuando controlan roedores.

Según su composición química en:

Insecticidas	Herbicidas	Fungicidas
Organoclorados	Dinitrofenoles	Compuestos de cobre, azufre
Organofosforados	Triazinas	Fenoles
Carbamatos	Acidos	Otros
Piretroides	Tricloroacéticos	
Otros	Otros	



Elementos importantes al leer en una etiqueta:

Ingrediente Activo: es el compuesto químico que ejerce la acción plaguicida. Este es el nombre que hay que identificar en la etiqueta de los plaguicidas.

Ingredientes inertes: Son los ingredientes cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo en una formulación determinada. Sin embargo, también pueden esconder sustancias tóxicas no declaradas.

Clasificación Toxicológica según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1975).

Esta es una clasificación, según su grado de peligrosidad, con base en la dosis letal media (DL50) de producto formulado, sólido o líquido, en ratas expuestas por vía oral o cutánea, es decir la dosis que mata a la mitad en promedio de la

población expuesta. La directriz de etiquetado de plaguicidas de la OMS recomienda que las etiquetas de los productos incluyan frases de advertencia que indica el grado de peligrosidad, una banda de color diferente por cada uno y símbolos pictográficos para cada categoría (**cuadro 1**).

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas según la OMS 1975

<u>Símbolo</u>	<u>Categoría de la OMS</u>	<u>Frase de Advertencia</u>	<u>Color de la banda</u>
Una calavera en un rombo	1ª Extremadamente peligroso	"Muy Tóxico"	Rojo
Una calavera en un rombo	1b Altamente Peligroso	"Tóxico"	Rojo
Una cruz en un rombo	II Moderadamente Peligroso	"Dañino"	Amarillo
-	III Ligeramente Peligroso ¹	"Cuidado"	Azul
-	IV Plaguicidas que parecen no representar peligro en condiciones normales de uso		Verde

Cabe advertir, que esta clasificación es limitada, sólo mide la toxicidad aguda, es decir los efectos a corto plazo, y no nos indica nada sobre sus efectos crónicos. Por lo que un plaguicida que aparezca con banda verde, en la categoría IV, como "aparentemente inocuo", puede sin embargo, tener un potencial de causar efectos crónicos graves. Es por ello que no debe ser sinónimo de que el plaguicida "es seguro".

2.7.2 DDT

2.7.2.1 Propiedades Físico-químicas del DDT

Sólido blanco, cristalino, insípido y casi inodoro

Fórmula Empírica: C₁₄H₉Cl₅

Masa Molecular Relativa: 354.5

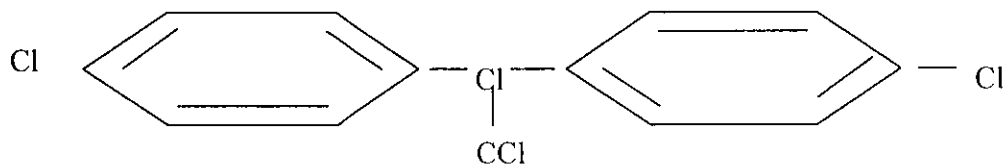
Punto de Fusión: 109 °C

Presión de Vapor: 2.53*10⁻⁵ Pa (1.9*10⁻⁷ mmHg) a 20 °C

Solubilidad:

Benceno	106 g/100ml.
Ciclohexanona	100 g/100ml.
Cloroformo	96 g/100ml.
Solventes del Petróleo	4-10 mg/100ml.
Etanol	1.5 g/100ml.
Agua	Insoluble

Sumamente estable.



Pp'-diclorodifenil-1,1,1, tricloroetano

Fig. 6. Estructura química del DDT (OMS, 1982)

El DDT o diclorodifeniltricloroetano, es el prototipo de los insecticidas de acción amplia y persistente. Es estable casi ante todas las condiciones ambientales y resistente a la descomposición completa por enzimas de los microorganismos del suelo y los organismos superiores, en ciertas condiciones puede durar más de 30 años, pues pequeñas cantidades de esta sustancia se quedan en el suelo y son transferidas lentamente a los cultivos o son arrastradas por corrientes de agua. Algunos de sus metabolitos, como el DDE, poseen estabilidad igual o mayor que el compuesto original. La persistencia del DDT y DDE en el medio ambiente obedece en especial a que ambos son solubles en las grasas y casi insolubles en agua. (OMS, 1982).

2.7.2.2 Absorción

Las vías de absorción potenciales son la inhalatoria, la oral y la dérmica. La inhalatoria por lo general es de poca importancia, ya que el tamaño de los cristales del DDT, 250 μm , evita su llegada a las profundidades del pulmón y paulatinamente son limpiadas por el epitelio respiratorio, para terminar siendo deglutidas. Sin embargo, la exposición por vía inhalatoria podría existir en el caso de la presencia de partículas pequeñas o por la volatilización del DDT lo cual permite la presencia del insecticida en la fase gaseosa. (ATSDR, 1994).

La vía oral es la más importante y en estudios controlados se ha demostrado que el pico máximo del DDT en sangre se alcanza tres horas después de la ingesta (ATSDR, 1994). La absorción por el tubo digestivo es lenta y en la linfa se recupera entre 47% y 65% de la dosis administrada (OMS, 1982). Asimismo, se conoce que la absorción del DDT se facilita en un ambiente graso, pero en el caso del insecticida se facilita la absorción por la presencia de la bilis o por componentes lipídicos de la dieta (OMS, 1982).

Finalmente, la absorción dérmica es limitada. Por ejemplo, la toxicidad del DDT por vía oral es 10 veces mayor que por vía dérmica (ATSDR, 1994). Un reporte

de monos expuestos a suelo contaminado por vía dérmica demostró una absorción del 3.3% (ATSDR, 1994).

2.7.2.3 Distribución

El DDT y sus metabolitos se distribuyen en diferentes tejidos de acuerdo al contenido de grasa, al flujo sanguíneo y al coeficiente de partición sangre:lípido de cada uno de dichos tejidos (ATSDR, 1994, OMS, 1982) . Por ejemplo, el cociente de concentración tejido adiposo/ sangre llega a 2808. El almacén en el tejido adiposo es más firme para el DDE y le siguieron en el siguiente orden el DDT y el DDD (ATSDR, 1994, OMS, 1982).

Además del tejido adiposo, el DDT se almacena en otros tejidos y de mayor a menor concentración serían: hígado, suprarrenales, corazón, páncreas, riñones, bazo y tiroides (OMS, 1982). El insecticida es capaz de traspasar la barrera placentaria y en fetos, para DDT, DDE y DDD, los tres tejidos en los que más se concentran son el riñón, el corazón y el tejido adiposo (OMS, 1982).

Un estudio realizado en voluntarios que recibieron DDT, demostró que una vez terminada la administración de la dosis, se observó una disminución lenta en las concentraciones del DDT depositado en el tejido adiposo. Los valores hallados después de 25.5 meses de recuperación variaron entre 32% y 35% de la cantidad máxima registrada en los depósitos de quienes habían recibido 35 mg/hombre/día, pero fueron de 66% en quienes sólo recibieron 3.5 mg/hombre/día, lo que indica que ocurrió una pérdida más lenta cuando las cifras de acumulación fueron menores (OMS, 1982).

2.7.2.4 Metabolismo

Los principales metabolitos del DDT son el DDD y el DDE. El DDD se continúa degradando hasta formar DDA el cual es excretado en la orina. En tanto el DDE

puede excretarse de manera inalterada pero también se han detectado derivados (OMS, 1982). Los derivados del DDE se excretan en la bilis por la vía del ácido mercaptúrico (que involucra formación de epóxidos y conjugación con el glutatión); en el intestino, estos derivados son modificados por la flora intestinal y una vez modificados son reabsorbidos. Al llegar al hígado, son tomados como sustratos para formar el DDE metil sulfonato (OMS, 1982., Johansson, 1998), el cual se distribuye por todo el cuerpo humano pero se almacena con firmeza en la corteza de la glándula suprarrenal (Johansson y cols., 1998, Jönsson y cols., 1992 y 1994).

El metabolismo del DDT en DDD y DDE se realiza en el hígado y algunos procesos que llevan a la formación de DDA se realizan en el riñón (ATSDR, 1994, OMS, 1982). No todos los metabolitos que se han detectado en animales se han encontrado en el hombre, por ejemplo, los hamsters no sintetizan DDE (OMS, 1982). El DDE es el metabolito que tarda más en eliminarse (ATSDR, 1994). Los isómeros o,p'- se excretan con mayor rapidez, probablemente debido a que sufren hidroxilaciones que no ocurren en los isómeros p,p'- (OMS, 1982). El metabolismo del DDT es más rápido en el adulto que en el neonato (OMS, 1982).

2.7.2.5 Excreción

El DDT puede excretarse por orina, por vía biliar, por leche y por semen (ATSDR, 1994). El indicador más confiable de excreción son los niveles de DDA en orina, los cuales llegan a permanecer por arriba de los niveles normales, aun meses después de terminada la exposición (ATSDR, 1994).

2.7.2.6 Grados de exposición y concentraciones en el ambiente

Al rociar DDT, cierta cantidad del insecticida no se adhiere al sitio contra el que se ha dirigido (OMS, 1982). Aún más de seis meses después de haberlo aplicado a un sembradío pueden detectarse vaporizaciones de DDT. La mayor parte permanece en la zona, pero una proporción deriva a escala mundial, repartiéndose en el aire en proporciones más o menos iguales (OMS, 1982). Se pueden encontrar concentraciones promedios en aire, agua, suelos e incluso en alimentos, principalmente en los de origen animal (Jensen y cols., 1997).

Las concentraciones máximas a las que se exponen los trabajadores (aproximadamente 7 mg/ m^3), resultan cuando se rocía el interior de los locales, como sucede en la lucha contra el paludismo. Sin embargo, las concentraciones aumentan considerablemente (hasta 104 mg/ m^3) en sitios donde se elabora y envasa el DDT. Casi todo el DDT en estos lugares de trabajo se encuentra en forma de aerosol y por el tamaño de las partículas y otros factores, la cantidad de insecticida que pueden inhalar los obreros es considerablemente inferior a la que reciben en las porciones descubiertas de la piel, a pesar de que se absorbe menos fácilmente por la piel que otros insecticidas organoclorados (OMS, 1982).

2.7.2.7 El DDT en México

La introducción del DDT en México siguió el mismo patrón que en muchos otros países; fue introducido a gran escala durante los años 50, a lo que siguió un uso extensivo en agricultura, especialmente en el cultivo del algodón. En algunas áreas de gran extensión se emplearon hasta 1000 toneladas por año, y su uso en la región de La Laguna se encontraba dentro de los más elevados al nivel mundial. El DDT ha sido sin duda el plaguicida más utilizado en la República Mexicana (Vega y Leon, 1992).

En 1968 la producción de DDT a cargo de la empresa Fertimex fue controlada por el gobierno. La empresa Fertimex, ubicada en Salamanca, Guanajuato, se privatizó en 1991 continuándose la producción y exportación de DDT ahora a cargo de Tekchem, quien estuvo obligada a satisfacer la demanda de la Secretaría de Salud, al ser esto parte de las condiciones de privatización de Fertimex. La producción controlada del DDT se tradujo en una mayor disponibilidad y bajo costo (Vega y Leon, 1992).

En 1987 diversas Secretarías de Estado se reunieron para conformar la Cicoplafest, la cual prohibió el uso en México de 6 plaguicidas organoclorados y el uso del DDT fue fuertemente restringido a campañas sanitarias con alrededor de 3,000 ton/año. A partir de entonces la producción de compuestos clorados ha experimentado un constante descenso (Vega y Leon, 1992).

En 1996, la misma Comisión comenzó a dar seguimiento al uso de plaguicidas enfocándose al ciclo de vida completo de los mismos e incorporando sectores como el laboral y de transporte. Se ha puesto especial atención en los compuestos clorados dada su persistencia y bioacumulación en seres vivos. Entre 1990 y 1996 las importaciones de DDT fueron de 27 toneladas, todas provenientes de los E.U. (Vega y Leon, 1992).

En el Plan de Acción Regional de América del Norte para el manejo del DDT adoptado en 1996, México se comprometió a lograr una reducción del 80% para el año 2000 y eliminar su uso para el 2002 siempre y cuando se encontraran opciones disponibles y eficaces para el control de vectores (Vejarano, 2000). El programa tuvo tanto éxito que para el año 2000 eliminó por completo su uso dos años antes de la fecha fijada (Medellín, 2002). Sin embargo informes extraoficiales han reportado su uso en zonas aisladas del país, a pesar de su prohibición.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los principales biomarcadores indicadores de los efectos del DDT sobre la biología del tejido mamario en ratas hembra.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la alteración en los niveles de estradiol y sus metabolitos (16 α - y 2-Hidroxiestrone) en orina por exposición al xenoestrógeno ambiental.
- Analizar la relación entre la variación de los niveles de hormonas sexuales y la exposición al xenoestrógeno ambiental en estudio.
- Describir el efecto genotóxico de la sustancia problema sobre la estructura celular de linfocitos, células de mucosa oral y tejido mamario.
- Describir el papel de la formación de radicales libres en el daño oxidativo sobre el tejido mamario, en condiciones de exposición a DDT.

4. HIPÓTESIS

La exposición crónica al xenoestrógenos ambiental DDT, provoca cambios a nivel metabólico y celular, tanto sistémico como local sobre el tejido mamario murino que contribuyen en la etiopatología del cáncer de mama.

5. VARIABLES

Variable Independiente:

- Exposición crónica a la mezcla de xenoestrógenos ambientales.

Variables Dependientes:

- Funcionalidad del sistema endócrino relacionado con hormonas sexuales.
- Características citofuncionales del tejido mamario glandular.
- Capacidad de respuesta de células sistémicas a agentes tóxicos.

5.1 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADORES	ÍNDICE	ESCALAS
Exposición crónica al xenoestrógeno ambiental	Poner en contacto con el xenoestrógeno ambiental a las ratas Wistar, por vía inhalatoria, durante un periodo de cinco meses	Tiempo de exposición	1-14 días aguda 15-90 días subcrónica 91 días en adelante crónica	Días de exposición
Funcionalidad del sistema endocrino relacionado con hormonas sexuales	Variación de los niveles sanguíneos de hormonas y sus metabolitos, por exposición crónica al xenoestrógeno ambiental	Niveles sanguíneos de hormonas y metabolitos hormonales	Cambio en los niveles presentes de hormonas y metabolitos hormonales en sangre	ng/ml
Características citofuncionales del tejido mamario glandular	Alteración de la estructura celular de células aisladas de tejido mamario, por exposición crónica al xenoestrógeno ambiental	Formación de radicales libres	Aumento en el índice de formación de radicales libres	$\mu\text{M/ml}$
Capacidad de respuesta de células sistémicas a agentes tóxicos	Alteración de la estructura celular de linfocitos, eritrocitos y células de mucosa oral, por exposición crónica al xenoestrógeno ambiental	Células micronucleadas Núcleos celulares dañados	Presencia de células micronucleadas Migración del ADN dañado (cola del cometa) Momento de la cola del cometa	% células micronucleadas μm % de ADN migrado X longitud de la cola del cometa

6. METODOLOGÍA

Tipo de estudio: experimental.

6.1 SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

Se estudiaron 30 ratas Wistar hembra, de 40 días de edad y de entre 100-150 gramos de peso que fueron divididas en tres grupos.

6.2 PATRÓN DE EXPOSICIÓN

Se formó **un grupo expuesto**, con 10 ratas que se expusieron al xenoestrógeno ambiental DDT grado reactivo 98 % de pureza (SIGMA) (**foto 1 y 2, anexo**), mediante la ruta inhalatoria, a una concentración aproximada de 7 mg/m³, concentración reportada por la OMS, 1982 para lugares cerrados con atmósfera saturada, durante 8 h por día, 6 días a la semana por un periodo de 5 meses, en una cámara de exposición diseñada para este modelo (**foto 3 y 4, anexo**); **un grupo control interno**, formado por 10 ratas, que se mantuvieron en exposición al solvente utilizado como vehículo para DDT (etanol absoluto) (**foto 5, anexo**) y **un tercer grupo como control externo** formado por 10 ratas, que fueron expuestas a aire atmosférico.

Para asegurar la exposición constante durante los cinco meses que duro esta fase, diariamente se agregó un volumen determinado de la solución problema.

6.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Antes de iniciar el estudio con el xenoestrógeno se determinó la dosis que produce daño (subletal crónica) en los animales pero que no les ocasiona la muerte en el periodo de estudio (Dawson y Trapp, 1999). Una vez determinada la dosis sub-letal crónica, se expuso al grupo problema a la sustancia en

estudio, durante un periodo de cinco meses; asimismo, el grupo control externo se expuso al aire atmosférico y el grupo control interno se expuso al vehículo utilizado. Transcurrido el periodo de tratamiento de 5 meses, se procedió a recolectar muestras de sangre periférica, mucosa oral, orina, y tejido mamario (fig 7).

Se colectaron muestras de orina para el análisis de la presencia y cuantificación de 2-hidroxiestrón y 16 alfa-hidroxiestrón mediante un inmunoensayo enzimático, para determinar la actividad como xenohormona de la sustancia problema.

Se colectó sangre periférica de cada animal, que se almacenó en tubos vacutainer heparinizados a 4°C (foto 6 y 7, anexo). La sangre fue tratada dentro de las 4 h siguientes a su recolección.

Se aislaron linfocitos por centrifugación en gradiente de Ficoll y lavados tres veces en solución salina amortiguada con fosfatos (Vaghef y cols., 1997). Las muestras de linfocitos perteneciente a cada animal se dividieron en dos alícuotas. Una alícuota fue guardada a -20°C. Una vez aislados los linfocitos se les realizó el estudio de electroforesis de célula única (prueba del cometa), para determinar daño genético.

Se realizaron frotis, tanto de sangre periférica, como de raspado de mucosa oral, para la determinación del índice de micronúcleos en eritrocitos, así como en células epiteliales de mucosa oral.

Se obtuvo tejido mamario de las ratas (biopsia), el cual se sometió a la prueba de peroxidación lipídica, para determinar formación de radicales libres y su posible efecto carcinogénico.

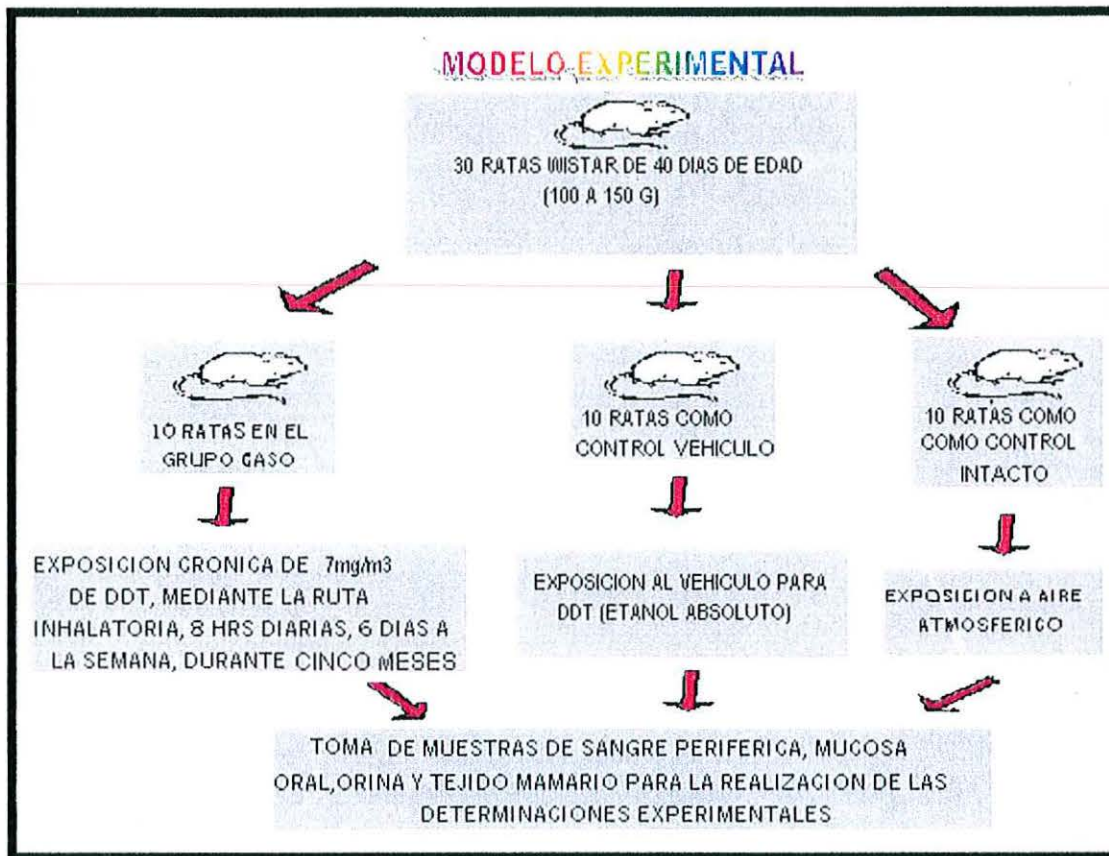


Fig 7. Modelo experimental

6.4 PARÁMETROS DETERMINADOS

Determinaciones experimentales: En las muestras de los animales. Se determinó la presencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica y en mucosa oral de carrillos, mediante las tinciones de Papanicolau y Wright-azul de cresil. Se realizó el ensayo de electroforesis de célula única (prueba del cometa) en linfocitos aislados de sangre periférica y tejido mamario según Singh y cols., (1988) con tiempos para lisis, desenmarañado y electroforesis de 60, 45 y 15 min, respectivamente. Se determinaron los niveles de 16 α -hidroxiestróna y 2-hidroxiestróna en orina mediante un paquete de ELISA desarrollado por Klug y cols. (1994). Así como para las hormonas FSH, LH, PRL, Estradiol y Testosterona mediante ensayos de ELISA. Además, se llevaron a cabo estudios de peroxidación lipídica de membranas celulares de

tejido mamario mediante un paquete desarrollado por Oxford Biomedical Research, Inc. (fig 8).

Los ensayos determinados en esta investigación (biomarcadores) se eligieron dentro del universo disponible debido a las características que poseen (sensibilidad, disponibilidad de equipo requerido y ejecución sencilla), que facilitan su ejecución dentro del estudio.

Análisis Estadístico: se utilizó el método de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de poner de manifiesto las diferencias intergrupales entre el grupo caso y el grupo control. ANOVA se define como una técnica en la que la varianza total de un conjunto de datos se divide en varios componentes y cada uno de ellos se asocia a una fuente específica de variación, de manera que durante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total (Dawson y Trapp, 1999). Este método tiene gran aplicación en el análisis de datos derivados de experimentos (Cochran y Cox, 1957, Dawson y Trapp, 1999, Daniel, 1998).

Cuando se encontró un valor significativo de F ($p < 0.05$), se aplicó la prueba de Tukey para realizar la comparación múltiple (Mosteller, 1968, Dawson y Trapp, 1999, Daniel, 1998). Todo esto se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS.

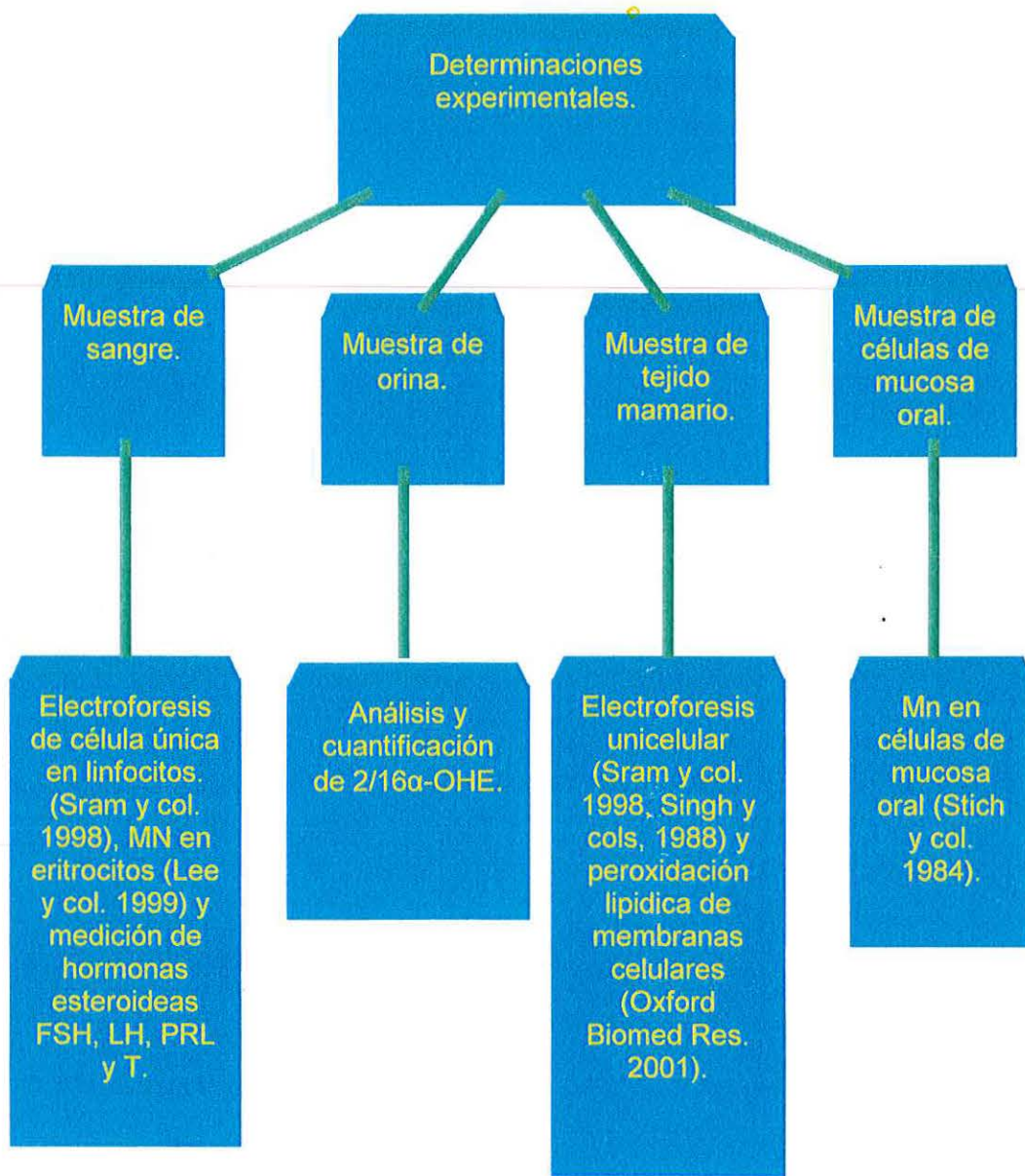


Fig 8. Determinaciones experimentales

6.4.1 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA 2-HIDROXIESTRONA Y 16 α -HIDROXIESTRONA EN MUESTRA DE ORINA

Las muestras de orina se colectaron 12 h antes de realizar el ensayo, en tubos estériles, las muestras fueron acidificadas con ácido bórico para evitar el crecimiento bacteriano; las muestras se mantuvieron a -4°C durante 24 h. Cada muestra de orina se decantó para eliminar los residuos y posteriormente se mezcló con mucho cuidado, para colocar alícuotas de 5 ml en tubos cónicos de 15 ml y se almacenaron a -70°C .

La medición de 2-hidroxiestróna y 16 alfa-hidroxiestróna, se realizó directamente con un paquete específico para inmunoensayo enzimático de alta afinidad, con anticuerpo murino específico para cada metabolito ligado a placas de ELISA (Estramet 2/16, Immuna Care Corporation, Bethlehem, PA) disponible comercialmente (Klug y cols. 1994). Cada ensayo se realizó por triplicado.

6.4.2 DETERMINACION DE LOS NIVELES DE LAS HORMONAS FSH, LH, PRL, ESTRADIOL Y TESTOSTERONA.

La determinación de los niveles de las hormonas sexuales FSH, LH, PRL, Estradiol y Testosterona, se llevó a cabo mediante pruebas de ELISA, a través de paquetes específicos comerciales desarrollados por ROCHE[®].

6.4.3 MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS

Se utilizó la tinción de Wrigth- Azul de cresil con el siguiente procedimiento: Se realizaron frotis sanguíneo, se fijaron con cito-spray, se dejó secar a temperatura ambiente por 1h, después se tiñeron con colorante de Wrigth por 3 minutos, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con azul de cresil por tres minutos, para finalmente lavarse con agua destilada.

Todos los portaobjetos se observaron en un microscopio equipado con cámara digital CCD y programas de cómputo para análisis de imágenes (analizador de imágenes Image-Database de Leica®). Para determinar la frecuencia de micronúcleos, se estudiaron 1000 células.

6.4.4 MICRONUCLEOS EN CÉLULAS DE RASPADO DE MUCOSA ORAL

Se realizaron frotis de raspado de mucosa bucal en portaobjetos y se fijaron con cito-spray. Una vez en el laboratorio, dichos portaobjetos se tiñeron mediante la técnica de Papanicolaou (Torres-Bugarín y cols., 1998; Karahalil y cols., 1999).

Todos los portaobjetos se observaron en un microscopio equipado con cámara digital CCD y programas de cómputo para análisis de imágenes (analizador de imágenes Image-Database® de Leica). Para determinar la frecuencia de micronúcleos, se estudiaron 500 células de mucosa bucal por sujeto.

6.4.5 ELECTROFORESIS DE CÉLULA ÚNICA O ENSAYO DEL COMETA

El ensayo del cometa en linfocitos aislados se llevó al cabo, según Singh y cols., (1988) con tiempos para lisis, desenmarañado y electroforesis de 60, 45 y 15 min, respectivamente. Se prepararon portaobjetos de vidrio con tres capas: 1) agarosa al 0.65 %, 2) mezcla de agarosa con bajo punto de fusión al 0.60 % y suspensión de células, 3) agarosa de bajo punto de fusión al 0.60 %. Estas tres capas se solidificaron consecutivamente a 4°C. Después se sometieron a la lisis celular por inmersión durante una hora a 4 °C en una solución compuesta por cloruro de sodio 2.5M, EDTA 0.1M, Dimetil sulfoxido al 10 %, sarcosinato lauril sódico al 1 % y Triton X-100 al 1 %. El desenmarañamiento y electroforesis se realizó en la oscuridad, en un amortiguador de EDTA (1 mM) y sosa (300 mM) con una corriente constante de 300 mA por 15 minutos. Después de esta operación, se neutralizaron los portaobjetos con un amortiguador de Tris durante 10 min y finalmente se tiñeron con bromuro de

etidio (20 mg/l) y se observaron en un microscopio de epi-fluorescencia Leica DMCS equipado con una cámara de vídeo Leica DC-100 (longitud de onda de excitación 515-560 nm, longitud de onda de emisión 590 nm)

Las muestras del ensayo del cometa fueron analizadas con un sistema de análisis de imagen de dominio público (NIH-Image program), desarrollado en US. National Institute of Health, disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image> (Helma y Uhl, 2000). Se registraron los siguientes parámetros para 50 imágenes por muestra: **longitud de la cola** (distancia entre el límite final de la cabeza del cometa y el límite final de migración del ADN) y **momento de la cola**. (el producto de la longitud de la cola y la cantidad de ADN en la cola) (Helma y Uhl, 2000).

6.4.6 DETERMINACIÓN DE RADICALES LIBRES MEDIANTE ESTUDIO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Principio de la técnica

Este ensayo se basa en el principio de la reacción de un cromógeno reactivo, N-metil-2-fenilindol (R1), con MDA y 4-hidroxyalkenos a 45 °C. Una molécula de MDA o 4-hidroxyalqueno reacciona con 2 moléculas del reactivo 1 este origina un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm.

Preparación de la muestra

Primeramente se removió la sangre del tejido por perfusión *in situ* con solución salina o con lavados con solución salina isotónica fría *in Vitro*. Se pesó el tejido, se homogenizó el tejido a 20 o 30% (2-3 gr de tejido en 10 ml de amortiguador) en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4, se añadieron 10 μ l 0.5 M Butil hidroxitolueno (BHT) en acetronitrilo a 1 ml de tejido homogenizado para prevenir la oxidación de la muestra. Posteriormente se centrifugó el homogenizado para remover partículas grandes (3000 x g a 4°C 10´), se separó una alícuota de la muestra para determinar la cantidad de proteínas. La

muestra fue congelada inmediatamente a -70°C hasta la realización del ensayo. Se tomaron 0.2 ml del homogenizado para el ensayo.

Procedimiento del ensayo para MDA + HAE

Los estándares se prepararon en tubos de micro centrifuga de polipropileno. Se recomienda que los estándares se corran por triplicado.

Se añadieron 200 μl de muestra dentro de un tubo de micro centrifuga, totalmente limpio, se agregó 650 μl de reactivo 1 diluido, la muestra se mezcló suavemente mediante vortex, se añadieron 150 μl de ácido metanosulfónico 15.4 M, se aseguró que estuviera bien mezclado, se incubó a 45°C por 60 min. Las muestras que mostraron turbidez fueron centrifugadas (15,000 x g por 10 min) se obtuvo el sobrenadante claro. Finalmente se transfirió el sobrenadante a una cubeta de lectura de espectrofotómetro, para leer a una absorbancia de 586 nm.

Para construir la recta de calibrado se utilizaron diluciones de concentración conocida a partir de una solución estándar de 4-hidroxinonenal 10 nM en acetonitrilo. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, y tanto el blanco como las diluciones de las muestras y los patrones, se realizaron con Tris-HCL 20 nM, pH 7.4 (Oxford Biomedical Research Inc. 2001).

7 RESULTADOS

7.1 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA 2-HIDROXIESTRONA Y 16 α -HIDROXIESTRONA EN MUESTRAS DE ORINA

Se encontró que la exposición crónica a DDT a una concentración de 7 mg/m³ induce cambios en el metabolismo del estradiol. La cuantificación de 2-OHE y 16 α -OHE realizada mediante el paquete comercial Estramet 2/16, arrojó los siguientes resultados. Para el metabolito 2-OHE no se encontró diferencia estadísticamente significativa al ser comparados entre ellos. La diferencia de medias entre el grupo de expuestos y el grupo control intacto fue de 0.20 con un error estándar (ES) de 0.44, para el grupo de expuestos contra el control vehículo fue de 0.25 con ES de 0.44, mientras que para el grupo control intacto comparados contra el control vehículo fue de 0.004 con ES de 0.44. En cuanto al metabolito 16 α -OHE este se ve aumentado de una forma significativa al comparar los valores medios del grupo expuesto contra el grupo control intacto; la diferencia de media entre estos dos grupos fue de 3.02 con ES de 1.02 ($p < 0.02$), una diferencia no significativa fue observada entre el grupo expuesto y el grupo control vehículo, la diferencia de medias entre estos grupos fue de 1.43 con un ES de 1.02; de igual forma se observó diferencia no significativa al comparar el grupo de control intacto contra el grupo control vehículo, la diferencia de medias para estos grupos fue de 1.59 con un ES de 1.02. Los valores medios mas el ES, para cada uno de los grupos y para cada metabolito por separado, son representados en las **figuras 9 y 10**.

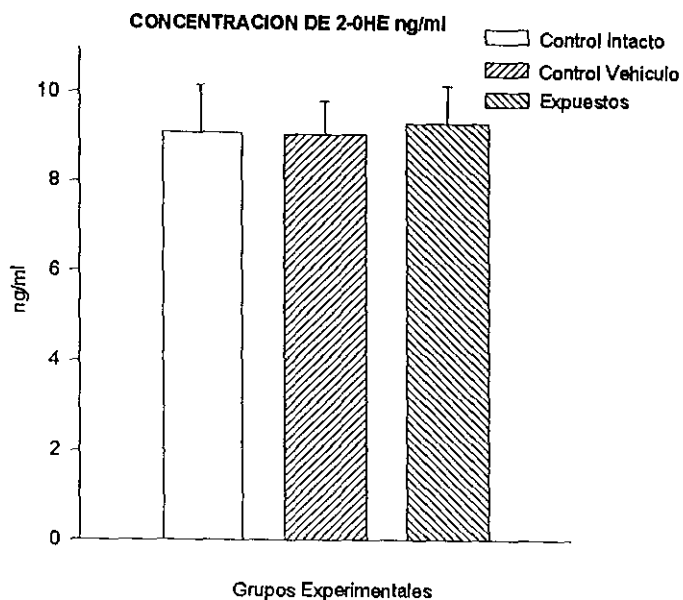
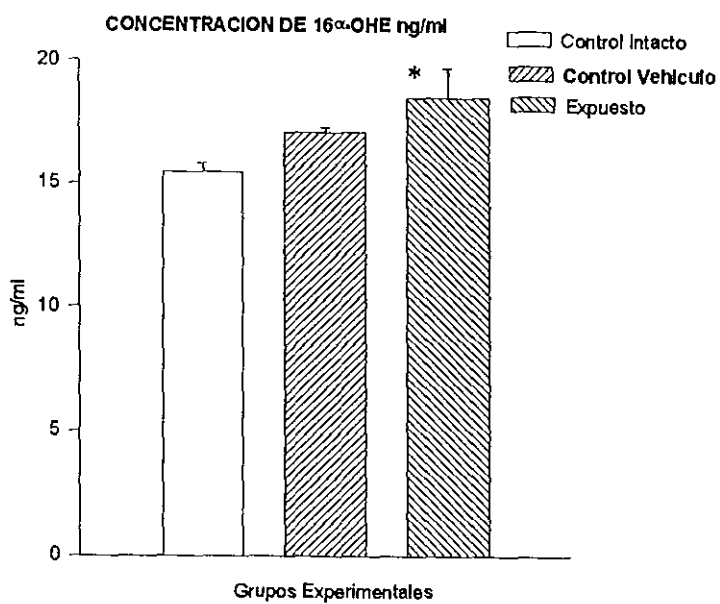


Fig 9. Concentración de 2-OHE en muestra de orina. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



**Fig 10. Concentración de 16 α -OHE en muestra de orina.
* = Significativamente diferente al control intacto a $p < 0.02$.**

7.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES HORMONALES DE FSH, LH, PRL, ESTRADIOL Y TESTOSTERONA EN SUERO

La determinación de los niveles para cada una de las hormonas se realizó mediante paquetes comerciales Roche[®], los resultados arrojaron que, al comparar los valores medios entre grupos y para cada hormona, la diferencia para FSH, Prolactina, Estradiol y LH fue estadísticamente no significativa, sólo en el caso de testosterona se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias del grupo expuesto contra los dos grupos control. La diferencia entre medias para FSH fue la siguiente, al comparar al grupo expuestos contra el grupo control vehículo fue de 0.78 con ES de 4.24, entre el grupo expuesto contra el grupo control intacto la diferencia fue de 6.17 con ES de 3.97, al comparar la media del grupo control vehículo contra el grupo control intacto la diferencia fue de 5.38 con ES 4.24. En cuanto al nivel de prolactina la diferencia, entre el grupo expuesto comparado con el grupo control vehículo fue de 0.51 con ES de 0.66, al comparar al grupo de expuestos contra el grupo control intacto la diferencia fue la siguiente 0.27 con ES de 0.66. En estradiol la diferencia entre el grupo expuesto y el grupo control vehículo fue de 2.37 con ES de 10.33, entre el grupo expuestos contra el control intacto fue de 8.75 con ES de 10.33, mientras que la diferencia entre el grupo control vehículo contra el grupo control intacto fue de 6.40 con ES de 10.33. En cuanto a LH la diferencia encontrada entre el grupo expuesto y el grupo control vehículo fue de 0.06 con ES de 0.21, entre el grupo de expuestos y el grupo control intacto la diferencia fue de 0.20 con ES de 0.21 y entre el grupo control vehículo y control intacto la diferencia fue de 0.27 con ES de 0.21. Para Testosterona la diferencia entre el grupo expuesto y el grupo control vehículo fue de 0.10 con ES de 0.02 ($p < 0.01$), entre el grupo expuesto y el grupo control intacto la diferencia fue de 0.16 con ES de 0.01 ($p < 0.01$) y por último la diferencia entre el grupo control vehículo contra control intacto fue de 0.05 con ES de 0.02. **El cuadro 2** muestra los valores medios para la concentración de cada una de las hormonas y para cada grupo, por separado.

Cuadro 2. Valores medios de los niveles de concentración, para cada una de las hormonas y para cada uno de los grupos experimentales.

Grupos Experimentales	Valores medios \pm ES para las concentraciones (ng/ml), N = 10, P < 0.05				
	FSH	Prolactina	Estradiol	LH	Testosterona
Expuesto	18.08 \pm 2.84	7.46 \pm 0.40	107.89 \pm 3.65	2.65 \pm 0.10	0.49 \pm 0.01*
Control Vehículo	17.29 \pm 3.04	7.98 \pm 0.12	105.54 \pm 3.85	2.59 \pm 0.05	0.60 \pm 0.02
Control Intacto	15.64 \pm 1.71	7.71 \pm 0.69	99.14 \pm 11.49	2.86 \pm 0.24	0.65 \pm 0.01

* = Significativamente diferente a $p < 0.01$ comparado con cada uno de los controles.

7.3 MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS

Se encontró que la exposición crónica a DDT a una concentración de 7 mg/ m³ indujo la formación de micronúcleos (MN) en eritrocitos bajo las condiciones del estudio (fig 11). En el grupo de ratas expuestas, el porcentaje máximo de MN fue de 21.8 y un porcentaje de 2.1 como el mas bajo, en el grupo control vehículo, el porcentaje mas alto fue de 1.4 y el mas bajo de 0.2 mientras que para el grupo control intacto el más alto fue de 1.1 y de 0.0 como el mas bajo. Se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias de los porcentajes \pm ES del grupo de animales expuestos 10.9 \pm 2.2 contra el grupo control vehículo 0.58 \pm 0.41 y el grupo control intacto 0.23 \pm 0.36. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar al grupo control vehículo contra el grupo control intacto (fig 12).

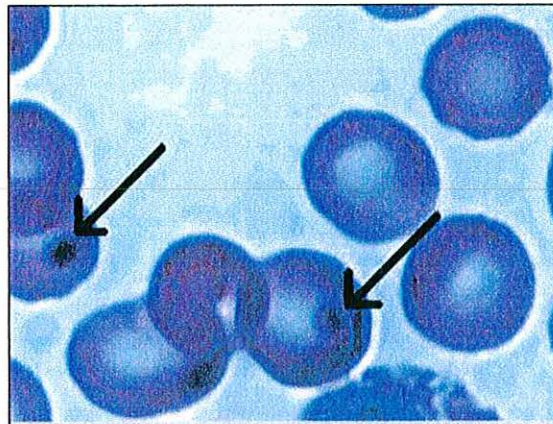


Fig. 11. Se observan dos eritrocitos micronucleados (flechas), así como varios eritrocitos normales, muestra tomada de un animal del grupo expuesto. 100X.

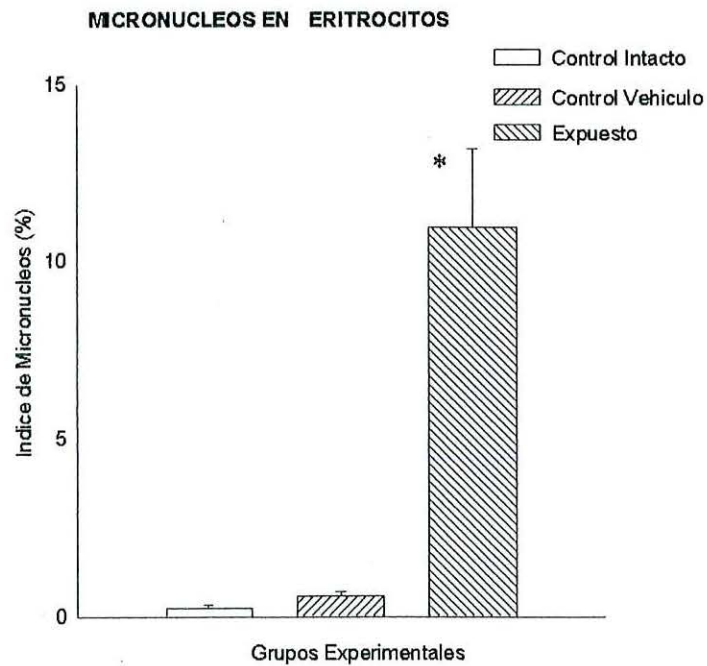


Fig 12. Índice de MN en eritrocitos.

* = Significativamente diferente a $p < 0.001$ al compararlo con cada uno de los controles.

7.4 MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE RASPADO DE MUCOSA ORAL

En células de mucosa oral, al igual que en eritrocitos, se observó que existe la formación de micronúcleos (**fig 13**). Una diferencia estadísticamente significativa fue encontrada al comparar el grupo expuesto (2.8 ± 0.44) contra 0.009 ± 0.006 del grupo control vehículo y 0.002 ± 0.002 del grupo control intacto ($p < 0.001$). Una diferencia no significativa fue encontrada al comparar al grupo control intacto contra el control vehículo (**fig 14**). Para esta prueba el porcentaje mas alto para el grupo de ratas expuestas fue de 5.2 y 1.0 como porcentaje mas bajo observado, para el grupo control vehículo el mas alto fue de 0.65 % y de 0.0 % el mas bajo mientras que para el grupo control intacto el mas alto fue de 0.22 y de 0.0 como el valor mas bajo encontrado.

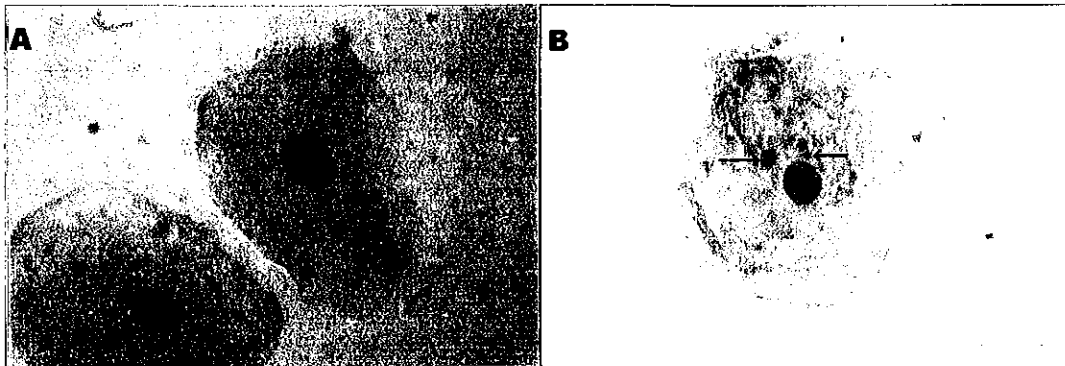


Fig 13. Típicas células de mucosa oral; célula normal (A), célula con dos micronúcleos (B). 40X.

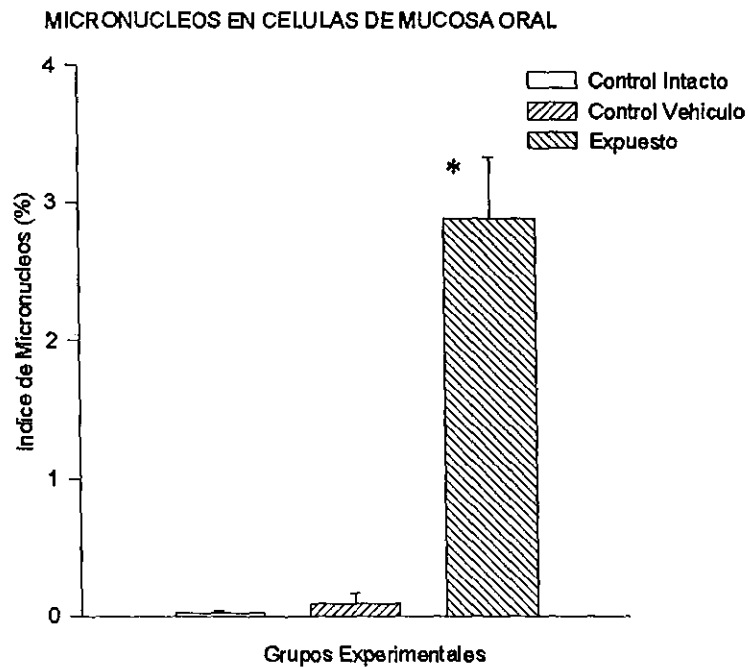


Fig 14. Índice de MN en células de mucosa oral.
 * = Significativamente diferente a $p < 0.001$ al compararlo con cada uno de los controles.

7.5 ELECTROFORESIS DE CÉLULA ÚNICA EN LINFOCITOS

Para medir el efecto genotóxico de la sustancia problema mediante la prueba del cometa, se tomaron en cuenta dos parámetros, longitud de la cola del cometa (μm) y momento de la cola del cometa. Los resultados obtenidos demuestran que, existe daño en los linfocitos de los animales expuesto, comparados con los del grupo control (fig 15). Una diferencia estadísticamente significativa se observó al comparar al grupo de expuestos con el grupo control intacto y control vehículo, la diferencia se observó en los dos parámetros. La diferencia de medias entre el grupo de expuestos y el grupo control intacto para el parámetro longitud de la cola fue de 110.5 con un ES de 6.7 ($p < 0.001$), la diferencia entre el grupo de expuestos contra el grupo control vehículo fue de 110.08 con un ES de 6.7 ($p < 0.001$), mientras que la diferencia entre el grupo

control intacto y el grupo control vehículo fue de 0.50 con ES de 6.7. Para el parámetro momento de la cola del cometa, la diferencia de medias entre el grupo expuesto y el grupo control intacto fue de 7,463.15 con un ES de 898.5 ($p < 0.001$), entre el grupo expuesto y grupo control vehículo, la diferencia fue de 7,284.1 con ES de 898.5 ($p < 0.001$), al comparar el grupo control intacto contra el grupo control vehículo la diferencia fue de 178.9 con ES de 898.5. Las **figuras 16 y 17** muestran los valores medios \pm ES para cada grupo y para los dos parámetros por separado.

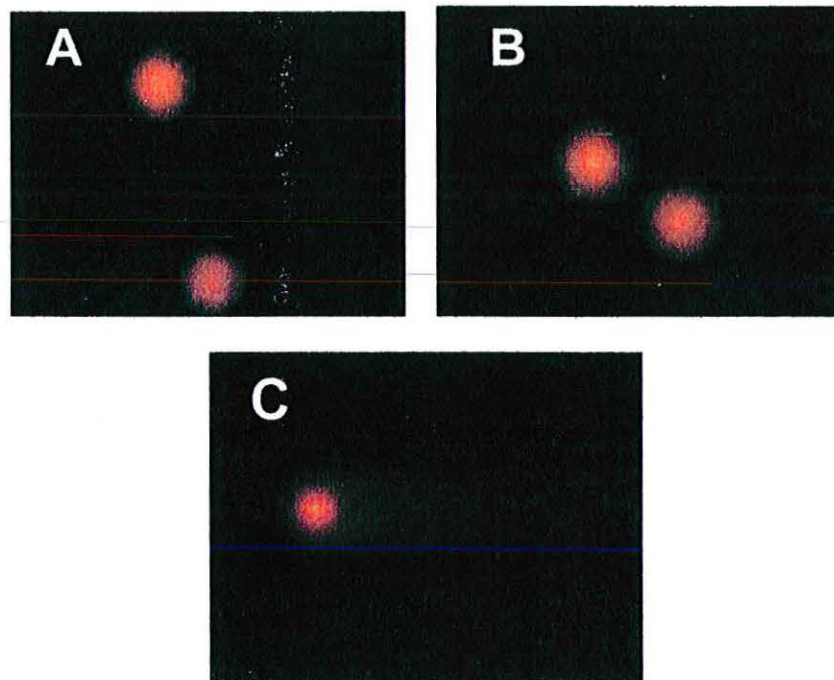


Fig. 15. Típica imagen de cometa en linfocitos del grupo control intacto (A), del grupo control vehículo (B) y del grupo expuesto (C). 20X.

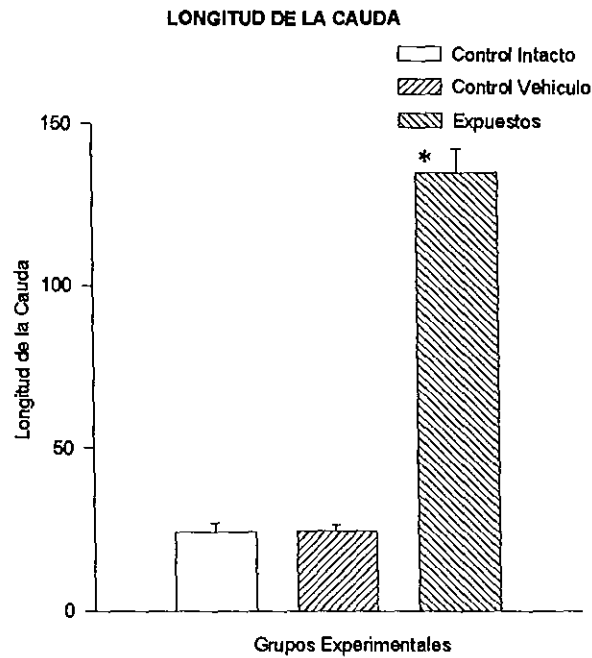


Fig 16. Migración de la cola del cometa en linfocitos.
 * = Significativamente diferente a $p < 0.001$ al compararlo con cada uno de los controles.

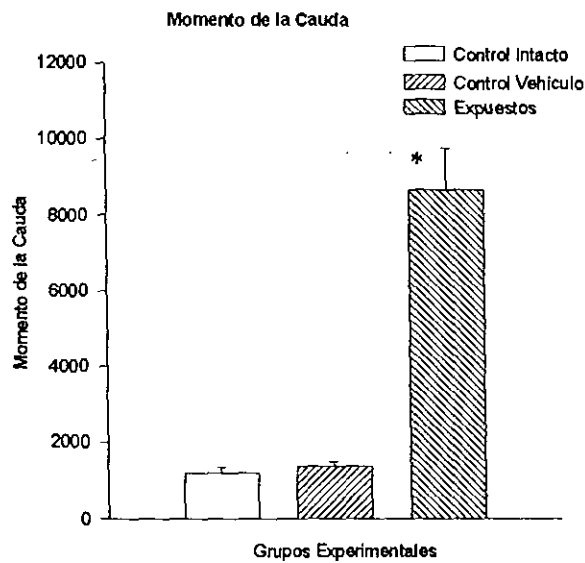


Fig 17. Momento de la cola del cometa en linfocitos.
 * = Significativamente diferente a $p < 0.001$ al compararlo con cada uno de los controles.

7.6 ELECTROFORESIS DE CÉLULA ÚNICA EN CÉLULAS MAMARIAS

Para medir el efecto genotóxico de la sustancia problema mediante la prueba del cometa, en células epiteliales mamarias, se tomaron en cuenta, al igual que para linfocitos, la longitud de la cola del cometa (μm) y el momento de la cola del cometa. La **figura 18** muestra un claro efecto sobre las células del grupo expuesto, en comparación con los dos grupos control. Los resultados obtenidos en células mamarias demuestran que, existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar al grupo de expuestos con el grupo control intacto y control vehículo, la diferencia se observó en los dos parámetros. La diferencia de medias entre el grupo de expuestos y el grupo control intacto para el parámetro longitud de la cola fue de $37.20 \mu\text{m}$ con un ES de 7.28 ($p < 0.01$), la diferencia entre el grupo de expuestos contra el grupo control vehículo fue de $32.30 \mu\text{m}$ con un ES de 7.28 ($p < 0.01$), mientras que la diferencia entre el grupo control intacto y el grupo control vehículo fue de $4.90 \mu\text{m}$ con ES de 7.28. Para el parámetro momento de la cola del cometa, la diferencia de medias entre el grupo expuesto y el grupo control intacto fue de 2,452.6 con ES de 523.8 ($p < 0.01$), entre el grupo expuesto y grupo control vehículo, la diferencia fue de 2,152.5 con ES de 523.85 ($p < 0.01$), al comparar el grupo control intacto contra el grupo control vehículo la diferencia fue de 300.03 con ES de 523.8. Las **figuras 19 y 20** muestran los valores medios \pm ES para cada grupo y para los dos parámetros por separado.

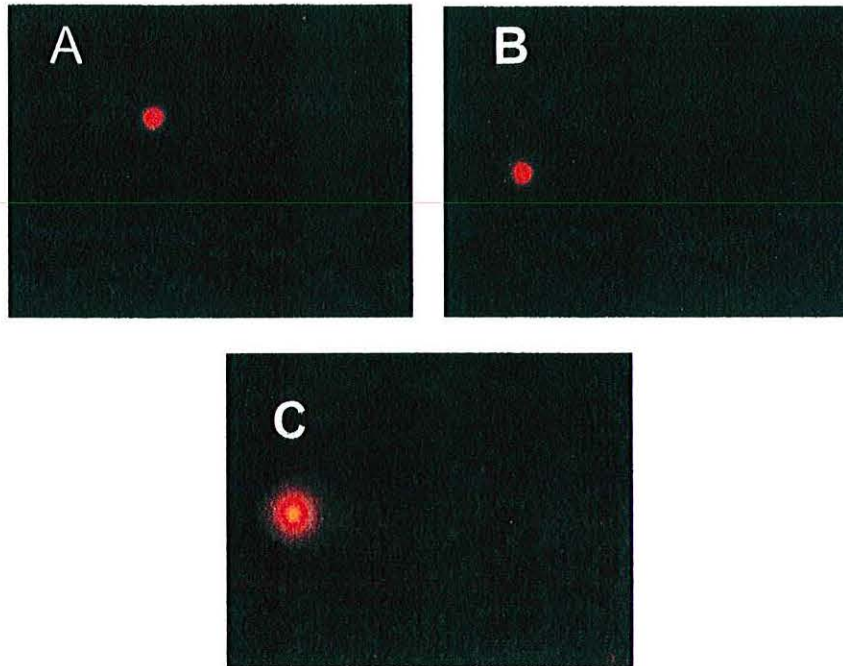


Fig. 18. Típica imagen de cometa en células epiteliales mamarias, célula del grupo control intacto (A), Célula del grupo control vehículo (B), célula del grupo expuesto (C). 20X.

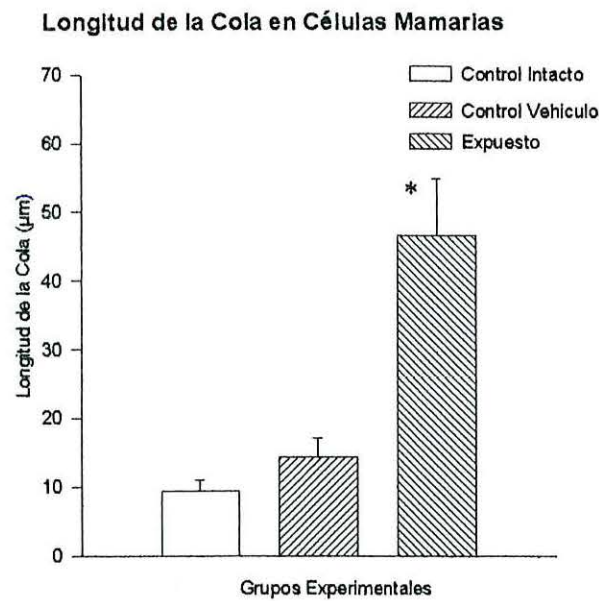


Fig 19. Longitud de la cola del cometa en células epiteliales mamarias.
 * = Significativamente diferente a $p < 0.01$ al compararlo con cada uno de los controles.

Momento de la Cola del Cometa en Células Mamarias

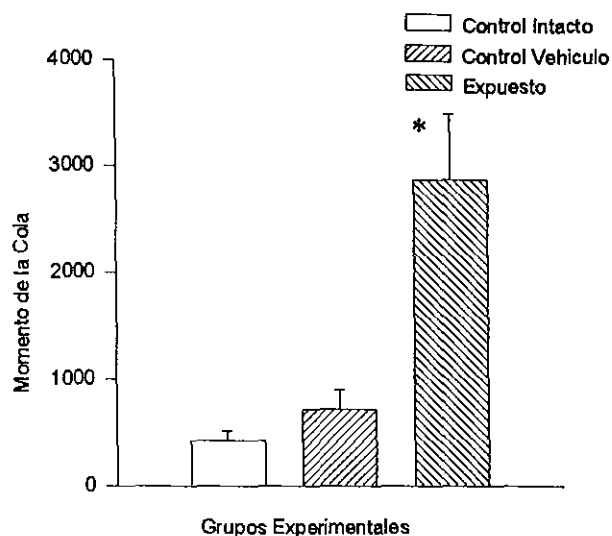


Fig 20. Momento de la cola del cometa en células epiteliales mamarias.
*** = Significativamente diferente a $p < 0.01$ al compararlo con cada uno de los controles.**

7.7 DETERMINACIÓN DE RADICALES LIBRES MEDIANTE ESTUDIO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La formación de radicales libres se determinó mediante la formación de MDA en tejido, en donde se observó que, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo expuesto y el control vehículo, la diferencia de medias para estos grupos fue de 1.68 con un ES de 0.53 ($p < 0.05$), una diferencia igualmente significativa se encontró al comparar al grupo de expuestos contra el grupo control intacto, en donde la diferencia de medias entre estos dos grupos fue de 2.10 con un ES de 0.53 ($p < 0.05$); no se observó diferencia significativa al compara al grupo control vehículo contra el grupo control intacto, la diferencia de medias entre estos grupos fue de 0.42 con un ES de 0.53 (fig 21).

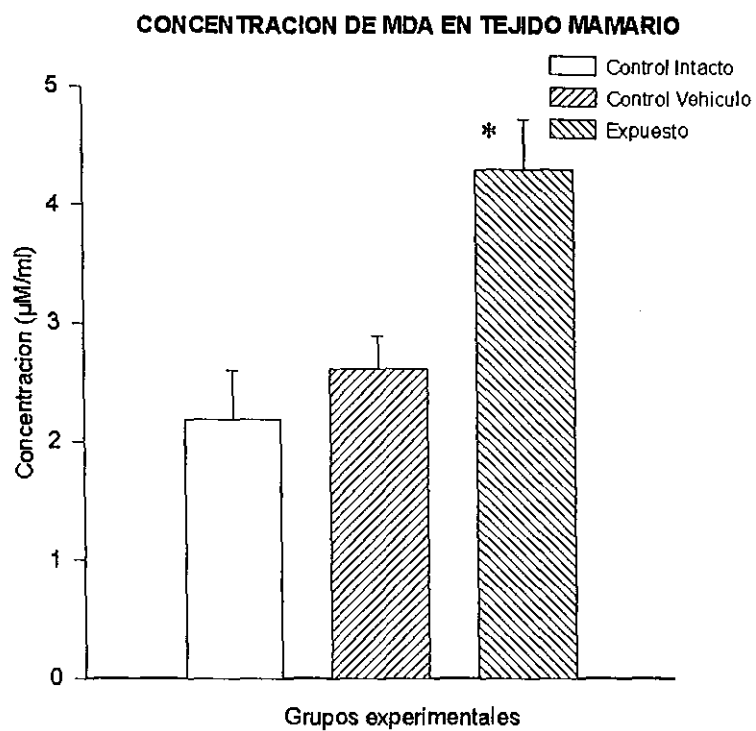


Fig 21. Concentración de MDA en tejido mamario.
*** = Significativamente diferente a $p < 0.05$ al compararlo con cada uno de los controles.**

8 DISCUSIÓN

La exposición crónica al xenoestrógeno ambiental DDT a una concentración de 7 mg/m^3 , produjo efectos, tanto en el ámbito sistémico, como local en tejido mamario de los animales en experimentación.

Existe la hipótesis que sugiere que compuestos que funcionan como xenoestrógenos afectan la cantidad y tipo de metabolitos de estradiol (Davis y col. 19997). Asimismo algunos investigadores apoyan la teoría de que algunos xenoestrógenos pueden unirse directamente al receptor a estrógeno y modular la proliferación celular y de esta forma, contribuir en el desarrollo de cáncer de mama y otras enfermedades relacionadas con hormonas (Aldercreutz y col. 1994, Davis y cols. 19993), o bien que la exposición a algún tipo de xenohormonas, puede ocasionar especies de oxígeno reactivo que pueden causar daño estructural al ADN (Dees y cols. 1997., Malins 1993., Ames y cols. 1995).

Se ha descrito que el metabolismo del estradiol es similar, tanto en ratas, como en humanos (Tsutsui y col. 1997). En el metabolismo del estradiol, se consideran principalmente dos rutas mutuamente exclusivas: una que origina 2-HOE, el cual presenta una débil actividad antiestrogénica y no es genotóxico (Suto y cols. 1993); la ruta alternativa origina 16α -HOE, el cual estimula el crecimiento de células mamarias, además de ser genotóxico (Telang y cols. 1992., Bradlow y cols. 1995).

Basándose en los resultados que arrojó la investigación se observó que existió una alteración en cuanto al metabolismo del estradiol, el cual se determinó sobre la base de la cuantificación de sus principales metabolitos 2-HOE y 16α -HOE en orina. En este aspecto, se observó que para 2-HOE, no existió diferencia significativa entre los tres grupos, caso contrario a lo que se observó con el metabolito 16α -HOE, en donde, se identificó una diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo control intacto, al comparar el grupo expuesto con el grupo control vehículo también se observó una diferencia,

aunque esta fue no significativa. De igual forma, no se encontró diferencia significativa al comparar al grupo control vehículo con el grupo control intacto. Los resultados obtenidos concuerdan con los de algunas investigaciones, tanto en mujeres con cáncer de mama, como en animales a los cuales se le indujeron tumores mamarios; en dichas investigaciones, han encontrado que existe un incremento en los niveles de 16 α -HOE en relación con los niveles de 2-HOE (Fishman y cols., 1995, Osborne y cols., 1993, Bradlow y cols., 1985). En otra investigación Telang y cols. (1992), han demostrado que existe una relación entre los niveles elevados de 16 α -HOE con el cáncer de mama en animales, además de que este metabolito resulta ser genotóxico para el epitelio mamario normal. En un estudio *in-vitro* en donde se utilizó una línea celular cancerosa mamaria (MCF-7), la cual fue expuesta a varios insecticidas organoclorados, entre ellos el DDT, evidencia que el DDT, así como los compuestos relacionados, incrementan de una forma significativa, la cantidad de 16 α -HOE, en comparación con las células de esta misma línea celular que se utilizaron como control (Bradlow y cols. 1995).

El sistema endócrino está compuesto de glándulas que secretan mensajeros químicos, que regulan diversas funciones del organismo, de una forma sutil y lenta. Las hormonas, que son producidas en las glándulas endócrinas, viajan a través del sistema sanguíneo hasta encontrar un receptor específico, con el cual se acopla en forma de llave-cerradura, para iniciar la respuesta biológica esencial, en el tejido blanco específico (Eubanks, 1997). Previamente se ha mencionado que químicos ambientales pueden alterar los niveles de proteínas sericas de unión, la síntesis de hormonas, así como el metabolismo hormonal (MacLachlan and Arnold, 1996, Mattison, 1983, Morse y cols., 1996). Los resultados del estudio demostraron que no existe variación en la mayoría de los niveles de las hormonas estudiadas (**cuadro 2**), ya que no se encontró diferencia significativa, al comparar los niveles hormonales de los grupos expuesto, control intacto y control vehículo. Sólo en el caso de Testosterona, se observó una diferencia significativa entre el grupo expuesto contra el grupo control intacto y control vehículo, mientras que la diferencia entre el grupo

control vehículo contra el control intacto fue no significativa. Los resultados obtenidos no concuerdan con otras investigaciones en donde se ha visto que xenohormonas del tipo fitoestrógenos, a dosis altas producen alteración en los niveles de hormonas pituitarias y pubertad precoz en ratas (Whitten y cols., 1994, Whitten y cols.,1995) y que una exposición a pesticidas organofosforados, reduce los niveles sanguíneos de LH y progesterona (Rattner y Michel, 1985).

Se ha descrito que las xenohormonas pueden actuar de una manera bifuncional, a través de la ruta genética o bien de la ruta hormonal, dependiendo del periodo y cantidad de la exposición (Davis y cols. 1997); por otra parte, se ha comunicado que la exposición a algunos xenoestrógenos así como metabolitos estrógenicos, pueden promover la producción de radicales libres mediante el ciclo de reducción del H_2O_2 por medio de la acción de la enzima P450 oxidasa y reductasa, lo que origina la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden ocasionar daño al material genético (Malins 1993).

El daño al ADN juega un importante papel en el desarrollo de cáncer (Oshimura y cols., 1986. Toker y Preston, 1996). Los resultados obtenidos acerca del poder genotóxico del DDT y sus derivados son contradictorios, existen estudios *in-vitro* así como *in-vivo*, que demuestran que dichos compuestos producen daño genético y cromosómico, tanto en humanos, como en animales (Palmer y Green, 1972. Shakar y cols., 1993).

Los resultados de nuestra investigación demostraron que la exposición crónica al xenoestrógeno ambiental, bajo las condiciones del estudio resulta en daño al material genético de eritrocitos; en los resultados obtenidos para la prueba de micronúcleos para este tipo de células, se observó que hubo una diferencia significativa entre el grupo expuesto contra el grupo control vehículo, de igual forma se encontró una diferencia significativa al comparar al grupo de expuestos contra el grupo de animales intactos. Los resultados demuestran que el vehículo utilizado como solvente no indujo la formación de micronúcleos, ya que al comparar los resultados obtenidos del grupo control intacto contra los del

grupo control vehículo, la diferencia encontrada no fue significativa. Para el grupo de animales expuestos se observó un índice medio de micronúcleos de 10.9, mientras que para el grupo control intacto fue de 0.23 y para el grupo control vehículo fue de 0.58.

En lo que se refiere al efecto genotóxico de la sustancia problema sobre células epiteliales de la mucosa oral, los resultados demostraron que la exposición inahlatoria a largo plazo induce la formación de micronúcleos en este tipo celular; ya que al comparar los resultados del grupo expuestos contra el grupo control intacto y grupo control vehículo, se observó una diferencia significativa, la cual no fue observada cuando se compararon los resultados del grupo control intacto contra el grupo control vehículo. El índice medio de micronúcleos en células de mucosa oral, para el grupo de animales expuestos fue de 2.8, mientras que para el grupo control intacto fue de 0.002 y para el grupo control vehículo fue de 0.009. Existen estudios que demuestran que la exposición a compuestos organoclorados puede inducir daño al material genético de distintos tipos celulares (Anwar, 1997), algunos estudios previos han reportado un incremento de MN, AC o SCEs en linfocitos de humanos expuestos a mezclas complejas de plaguicidas (Bolognesi y cols., 1993, De Ferrari y cols., 1991, Kouraskis y cols., 1992) los resultados del presente estudio concuerdan, de igual forma con los obtenidos en una investigación en donde, se evaluó la inducción de MN en eritrocitos de medula ósea de ratón, expuestos a dos tipos de plaguicidas: fosfamidon y dieldrin; los resultados demuestran claramente que ambos plaguicidas inducen de una forma significativa el incremento de MN, de manera dosis-dependiente, tanto a dosis sub-letal como a dosis letal (Cicchetti y cols., 1999). La frecuencia de rompimiento de cromátidas fue estudiada en un grupo de trabajadores agrícolas que estuvieron expuestos a plaguicidas organoclorados, organofosforados, fenolicos y carbamatos; en este estudio se observó que la frecuencia de ruptura de cromátidas fue mas alta en las personas que estuvieron expuestas, comparadas con los controles (Yoder y cols., 1973). En otro estudio, trabajadores de la India, que estuvieron expuestos a varios pesticidas como DDT, Lindano, Quinalfos, Paration, Diclorvos y Dieldrin

presentaron un aumento significativo en la frecuencia de rompimiento de cromátidas (Rita y cols. 1987). Por otro lado en North Carolina, se realizó, un estudio el cual evaluó los efectos genotóxicos de los depósitos de plaguicidas, sobre las personas que viven en las cercanías de estos sitios, en el estudio no se encontró una asociación consistente entre el lugar de residencia con la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos (Vine y cols., 2000). En otro estudio, se evaluó la inducción de micronúcleos *in-vitro* por exposición a compuestos organoclorados en fibroblastos de piel de ballena. En este estudio se concluyó que la exposición a altas concentraciones de Clordano, DDT, Toxfano inducen formación de micronúcleos (Gauthier y cols., 1998). Datos contradictorios se han reportado sobre el potencial del DDT y sus compuestos, para inducir rompimiento cromosómico (Mahr y Miltenburger, 1976., Kelly y Legator, 1977).

Respecto a los estudios de genotoxicidad, se les ha puesto especial atención a aquellos ensayos que se enfocan sobre los efectos citogenéticos o rompimiento y pérdida de cromosomas, ya que estos efectos pueden estar relacionados con el desarrollo de diversas patologías en las cuales se incluye el cáncer (WHO, 1985, Carrano y Natarajan, 1998,). Dependiendo de las condiciones experimentales, varios tipos de daño genético, como rompimiento de hebras simples, o rompimiento de doble hebra en el ADN, daño oxidativo, sitios lábiles al álcali, puede ser detectado mediante la prueba del cometa (Fairbair y cols.,1995, Anderson y Plewa, 1995). Células primarias de varios órganos, tanto de roedores, como de humanos, y líneas celulares de diversos mamíferos, se han usado y se ha demostrado que con la prueba del cometa se es capaz de detectar los efectos genotóxicos de una gran variedad de contaminantes ambientales (Anderson y Plewa, 1995, Makelvei-Martin y cols., 1993).

En el presente estudio se realizó la prueba del cometa para evaluar el efecto genotóxico del DDT, por exposición crónica, sobre linfocitos, así como sobre células epiteliales mamarias y los resultados demostraron que la sustancia problema induce daño genético en los tipos celulares estudiados. Los parámetros que se tomaron en cuenta para medir el daño genético fue la

longitud de la cola de los cometas y el momento de la cola, ya que estos parámetros son los que reflejan mejor, la sensibilidad de la prueba (Anderson y Plewa, 1995). Los resultados para estos dos parámetros en el estudio en linfocitos demostraron que existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y los dos grupos control; una diferencia no significativa se observó entre el grupo control-vehículo y control-intacto. Los valores medios para cada uno de los grupos, para el parámetro **longitud de la cola** fueron los siguientes, para el grupo expuesto 134.8 μm , para el grupo control vehículo 24.7 μm , y para el grupo control intacto 24.2 μm . para el parámetro **momento de la cola**, los resultados para el grupo expuesto 8662.1, para el grupo control vehículo 1377.9 y para el grupo control intacto 1198.9.

En lo referente a los datos obtenidos de la prueba sobre tejido mamario, los resultados mostraron la misma tendencia que en linfocitos, ya que una diferencia significativa fue observada al comparar los datos del grupo expuesto con los de los dos grupos control, pero al comparar el grupo control-vehículo contra el grupo control-intacto, la diferencia fue no significativa, aunque cabe mencionar que los resultados muestran un efecto menos severo que en linfocitos. Esta diferencia se mostró de forma similar para los dos parámetros. Los resultados medios para la prueba del cometa en células mamarias fueron:. Para el parámetro **longitud de la cola**, en el grupo expuesto fue 46.6 μm , para el grupo control vehículo fue 14.3 μm y para el grupo control intacto fue 9.4 μm . Para el parámetro **momento de la cola** los resultados para el grupo expuesto fue 2869.3, para el grupo control vehículo fue de 716.7 mientras que para el grupo control intacto fue de 416.7. Como anteriormente se ha mencionado, existen estudios que han demostrado que la exposición a DDT causa daño al material genético; así, existen investigaciones que han demostrado que el ensayo del cometa puede ser usado para medir el daño ocasionado al material genético por contaminantes ambientales, como es el caso del DDT (Fairbair y cols.,1995, Anderson y Plewa, 1995)., En un estudio se trato de correlacionar los niveles de DDT en sangre con el nivel de fragmentación de ADN en célula sanguíneas de mujeres expuestas a DDT y sus respectivos controles, en dicha

investigación, se demostró que existe una mayor frecuencia de “cometas” en células mononucleares del tejido sanguíneo de mujeres indígenas expuestas al DDT (Villarini y cols., 1998). En un estudio experimental que se realizó para tratar de evaluar el daño ocasionado por distintos compuestos químicos, entre ellos el DDT, en diferentes órganos, tanto de ratas, como de ratones, mediante la prueba del cometa, se demostró que el DDT indujo daño en todos los órganos, excepto para cerebro y médula espinal (Sekihashi y cols., 2002)

Sin embargo existen estudios que no concuerdan en cierta forma, con los resultados obtenidos en nuestro estudio, como los obtenidos en una investigación en donde se evaluó el daño genético en leucocitos obtenidos de mujeres que sufren de cáncer de mama y que estuvieron expuestas a DDT y otros contaminantes ambientales; así mismo estos resultados se compararon con los de mujeres que están afectadas con cáncer mamario, el ensayo del cometa demostró ser sensible para detectar daño genético entre individuos expuestos a contaminación atmosférica, pero no entre sujetos expuestos a DDT, aunque los autores de dicha investigación comentan que los resultados obtenidos pueden ser atribuidos a que los niveles de DDT encontrados en sangre fueron muy bajos (Valverde M y cols., 1999).

Es interesante mencionar que, la prueba del cometa, ha sido utilizada en estudios con mujeres con cáncer de mama o bien que tienen el gen BRCA1 y/o BRCA2 mutados, y que, los resultados de estas investigaciones demuestran que las pacientes con cáncer de mama presentan niveles basales de daño genético mas alto que sus comparativos controles, lo cual indica que existe una asociación entre la enfermedad maligna y el incremento de daño genético o bien que esos pacientes tienen ADN mas frágil que los individuos sanos (Vaghef y cols., 1997) y por otro lado, que las mujeres que tienen mutado el gen BRCA 1 y/o BRCA2 son mas sensibles a sufrir daño genético (Trenz y cols., 2002).

La exposición de los organismos vivos a contaminantes ambientales origina reacciones entre los sistemas biológicos en cuestión: Reacciones que pueden

originar un desequilibrio bioquímico o bien una respuesta adaptativa (Masfaraud y cols., 1992), el metabolismo o biotransformación de contaminantes por parte del organismo vivo son rutas necesarias para la desintoxicación y excreción de los compuestos químicos lipofílicos (Goksoyr y Förlin, 1992). En algunos casos, dependiendo del tipo y concentración del agente tóxico, su biotransformación puede involucrar reacciones de óxido-reducción y/o transferencia de electrones no acoplados, reacciones que pueden producir especies de oxígeno reactivo derivados del agente químico (Karuzina y Archacov, 1994). Esas especies pueden reaccionar con ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas, dañando a la célula (Freeman y Crapo, 1982, Marnett, 1998). La generación de radicales de oxígeno y otros procesos pro-oxidantes se han relacionado con la etiología de varias enfermedades humanas (Halliwell, 1987).

La lipoperoxidación es un mecanismo de daño celular ya establecido, tanto para plantas como en animales y es usado como un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen a diferentes formas complejas. Los peróxidos de ácidos grasos polinsaturados generan malondialdehído y 4-hidroxyalquenos, los cuales son usados como indicadores de lipoperoxidación (Esterbauer y cols., 1991). En el presente estudio se evaluó la influencia de la sustancia problema, sobre la formación de radicales libres en tejido mamario, con el fin de determinar si existe la inducción de daño celular por efecto de estrés oxidativo. Los resultados demuestran que existe un aumento significativo en el índice de lipoperoxidación, en el grupo expuesto, en comparación con los controles. En contraste, al comparar los dos grupos controles, los resultados demostraron que no existe diferencia significativa entre los valores de esos grupos. El índice de lipoperoxidación se determinó mediante la concentración de MDA en homogenado de tejido mamario. La concentración media para el grupo expuesto fue de 4.3 μM , mientras que para el grupo-control vehículo fue de 2.6 μM , y para el grupo control-intacto fue de 2.1 μM . Se ha comunicado que los hidrocarburos cíclicos polihalogenados, algunos pesticidas órganofosforados y herbicidas clorados, producen problemas tóxicos debido a su alta persistencia en el ambiente y

habilidad para acumularse en tejido adiposo; dichos reportes demuestran que la administración de pesticidas con diversas estructuras químicas, inducen lipoperoxidación en hígado y cerebro, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, lo que sugiere que las especies de oxígeno reactivo pueden estar involucrados en las manifestaciones tóxicas de esos pesticidas (Bagchi y cols., 1995). Estudios llevados a cabo sobre pacientes con cáncer de mama, han encontrado que los niveles de MDA se encuentran elevados en el suero de las pacientes (Wang y cols., 1996). En otros estudios de igual forma, sobre mujeres con cáncer de mama han encontrado un aumento en el índice de estrés oxidativo (Boyd y McGuire, 1991) y además se ha comunicado que existe un aumento de peroxidación lipídica y aumento en la formación de aductos de MDA-ADN en tejido mamario de pacientes con cáncer de mama (Nath y cols., 1995).

En resumen; de acuerdo con los resultados obtenidos, la exposición crónica al xenoestrógeno ambiental DDT, produce efectos, tanto a nivel sistémico como local en tejido mamario, que en otras investigaciones, han sido relacionados con el desarrollo de carcinoma de glándula mamaria. De los principales efectos observados se encuentra que existe una alteración en el metabolismo del estradiol, ya que se observó un aumento en el nivel de 16α -OHE, el cual es considerado, como tumorigénico y genotóxico, además de poseer una alta actividad estrógena (Telang y cols., 1992). Varias investigaciones sugieren que los productos de la 16α -hidroxilación de estrógenos es un marcador biológico de riesgo para cáncer de mama, que puede contribuir de forma directa a la iniciación y progresión de la enfermedad, ya que la 16α -OHE, producto de la 16α -hidroxilación del estradiol, causa una respuesta de crecimiento prolongado debido a su propiedad de unirse covalentemente al receptor a estrógeno (Swanek y Fishman, 1988).

Otro de los efectos que puso en evidencia esta investigación fue un aumento en el índice de lipoperoxidación, el cual se ha relacionado con un aumento en la generación de especies de oxígeno reactivo que a su vez lleva a un estado de estrés oxidativo (Huang y cols., 1999). Al estrés oxidativo se le ha atribuido un

papel importante en el proceso de carcinogénesis; asimismo hay, datos que indican que las especies de oxígeno reactivo están involucrados en la iniciación y promoción de cáncer (Trush y Kensler, 1991, Rice-Evans y Burdon 1993, Ames 1983).

Además, los resultados demostraron que la sustancia problema (DDT) resultó genotóxica, tanto en células sanguíneas como mamarias; el efecto genotóxico se demostró mediante los ensayos de MN y prueba del cometa; biomarcadores que actualmente son de los más aceptados dentro del ámbito científico, para detectar fragmentación y pérdida cromosómica, así como sitios lábiles al álcali (Kuchenmeister y cols., 1998, Bolognesi y cols., 1993). Actualmente, el rompimiento cromosómico, la pérdida de cromosomas y los sitios lábiles al álcali son indicadores de exposición a compuestos genotóxicos, los cuales incrementan el riesgo de cáncer en diversos tejidos (Oshimura y Barrett, 1986, Tucker y Preston, 1996).

Es de gran trascendencia puntualizar la importancia del empleo de **biomarcadores** dentro del campo de la salud ambiental, ya que estos nos permiten estimar los riesgos de situaciones y procesos contaminantes en un escenario determinado, valorando los efectos reales sobre la salud de los organismos y poblaciones, la biodisponibilidad del contaminante ambiental y su riesgo real. Por ejemplo, durante la fase de diagnóstico ambiental de un sitio, se pueden encontrar niveles altos de un contaminante en el ambiente. Dichos valores serían indicativos de riesgo, pero si la biodisponibilidad (capacidad de absorción) del contaminante es baja, aún con valores altos en el ambiente, su riesgo sería mínimo. En este caso el uso de biomarcadores sería de gran utilidad para medir las alteraciones celulares bioquímicas o moleculares en tejidos, células y fluidos provocados por la presencia del contaminante, cambios que posteriormente pueden desarrollar alguna enfermedad; Es decir nos permite identificar grupos de personas en las que puede incrementarse el riesgo de presentar algún tipo de proceso patológico ocasionado por factores ambientales, como es el caso del cáncer de mama.

Dentro del campo de la epidemiología molecular, en donde para evaluar riesgos en la salud, no se toma a la enfermedad si no a los biomarcadores, estos nos permiten detectar riesgo de importancia medica, en etapas preclínicas de la enfermedad lo cual puede ser de utilidad como sistema de monitoreo ambiental y vigilancia epidemiológica, es decir, con un enfoque más preventivo.

9 CONCLUSIONES

- ◆ La exposición crónica a DDT, origina un aumento en la producción de 16α -HOE, el cual es genotóxico y posee una alta actividad estrógenica.
- ◆ La exposición crónica al xenoestrógeno ambiental DDT, no provoca variación en los niveles de las hormonas sexuales FSH, LH, PRL, y Estradiol pero sí en Testosterona.
- ◆ El DDT bajo las condiciones del estudio, provoca daño sobre el ADN de células sistémicas y células mamarias.
- ◆ El xenoestrógeno ambiental empleado (DDT), provoca un aumento en la formación de radicales libres, bajo las condiciones de exposición.
- ◆ El daño observado sobre el material genético, puede ser el efecto del aumento en la formación de radicales libres o por aumento de la ruta genotóxica del metabolismo del estradiol.
- ◆ El aumento en el nivel del metabolito del estradiol (16α -HOE), la determinación de radicales libres y el análisis del daño sobre el material genético, pueden ser utilizados como biomarcadores indicadores de los efectos locales y sistémicos del xenoestrógeno sobre los elementos epiteliales de la glándula mamaria, con estrecha relación con la formación de tumores malignos (carcinomas).
- ◆ Los estudios con el uso de biomarcadores en poblaciones permiten la estimación de riesgos a la salud, en etapas tempranas de la patología, por lo que es posible establecer acciones preventivas en la población.
- ◆ Esta investigación puede tomarse como base para el diseño de estudios epidemiológicos que permitan establecer asociaciones causales entre contaminantes ambientales y salud.

- ◆ Los datos biológicos de los efectos de los contaminantes ambientales en salud deben ser la base para la implementación y evaluación de los programas de control que establezcan las autoridades.

10 RECOMENDACIONES

La relevancia de los resultados de la presente investigación pone de manifiesto la necesidad de emitir las siguientes recomendaciones.

A futuras investigaciones

Se recomienda la elaboración de estudios de casos y controles con el uso biomarcadores como los utilizados en esta investigación, en poblaciones expuestas o que estuvieron expuestas a contaminantes ambientales como es el caso de los plaguicidas y así evaluar los efectos que estos ocasionan sobre la salud de la población.

Se recomienda el uso de la prueba del cometa, micronúcleos, lipoperoxidación y análisis de metabolitos del estradiol, como biomarcadores eficientes y sensibles en investigaciones en el campo de la salud ambiental que estén encaminadas a evaluar el efecto de contaminantes ambientales del tipo hidrocarburos sobre la salud de los seres vivos.

Se recomienda llevar a cabo, no solo, estudios que tengan como objetivo evaluar el riesgo de los contaminantes tipo xenoestrógenos sino, también de otras muchas sustancias que ocasionan, severos efectos adversos sobre la salud, esto representaría un avance sumamente importante para los objetivos de la salud ambiental que son el cuidado del ambiente y la salud de la población.

Por ultimo se recomienda utilizar biomarcadores de riesgo siempre que sea posible y así poder clasificar a la población en grupos con distinta susceptibilidad de riesgo.

A la secretaria de salud

Se recomienda reducir la exposición a sustancias tóxicas al mínimo tanto en ambientes laborales como en espacios abiertos ya que esto se traduciría en una reducción del riesgo de desarrollar enfermedades con estrecha relación a tóxicos ambientales.

Elaborar estudios que tengan como objetivo identificar personas con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama, en zonas que estuvieron expuestas por mucho tiempo a DDT.

Implementar el uso de biomarcadores de riesgo en los centros de atención social, como practica de rutina encaminadas a la prevención temprana de la enfermedad.

A los responsables del control de sustancias tóxicas

Por el momento, es necesario la elaboración de estudios mas precisos para determinar si los productos químicos sintéticos que han ayudado al desarrollo humano, también afectan la salud de los individuos y de la población en conjunto. Por otro lado no sólo los productos ya existentes deben ser estudiados, sino que igual manera, se requieren pruebas de toxicidad, carcinogenicidad y de actividad hormonal, para los nuevos productos químicos, antes de ser lanzados al mercado.

11 BIBLIOGRAFÍA

Anderson D, Plewa MJ. The international comet assay workshop, *Mutagenesis* 13:67-73 (1995).

Alvarez-Moya C. *Genética, ambiente y salud*. Ed. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México (2000).

Aldercruz H, Gorbach SL, Goldin BR, Woods MN, Dwyer JT, Hockerstedt K, Wahala K, Hase T, Hamalainen E, Foslis T. Estrogen and metabolite levels in women at risk for breast cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 35:703-709 (1994).

Aldercruz H, Mousavi Y, Hockerstedt K. Diet and breast cancer. *Acta Oncol* 31:175-181 (1992).

Ames B, Gold LS, Willett WC. The cause and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5258-5265 (1995).

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*. 221:1256-1264 (1983).

Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat Res* 377:95-104 (1997).

Anwar WA. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ Health Perspect* 105:801-806 (1997).

ATSDR. Toxicological profile for 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, and 4, 4'-DDD. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. US Public Health Service. Atlanta, GA.(1994).

Au WW, Sierra-Torres CH, Cajas-Salazar N, Shipp BK, Legator MS. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environ Health Perspect* 107:501-505 (1999).

Astrup H, Daneshvar B, Dragsted LO, Gamborg M, Hansen AM, Loft S, Okkels H, Nielsen F, Nielsen PS, Raffn E, et al. Biomarkers for exposure to ambient air pollution - Comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect* 107:233-238 (1999).

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104:129-140 (1995).

Binková B, Topinka J, Mráčková G, Gajdošová D, Vidová P, Stávková Z, Peterka V, Pilčůk T, Rimár V, Dobiáš L, et al. Coke oven workers study: the effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct in white blood cells and lymphocytes as determined by ³²P-postlabelling. *Mutat Res* 416:67-84 (1998).

Bolognesi C, Parrini M, Bonassi S, Ianello G, Salanitto A. Cytogenetic analysis of a population occupationally exposed to pesticides. *Mut Res* 285:239-249 (1993).

Boyd NF, McGuire V. The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radic Biol Med* 10:185-190 (1991).

Bradlow HL, Davis DL, Lin G, Sepkovic D, Tiwari RK. Effects of pesticides on the ratio of 16 α /2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ Health Perspect* 103:147-150 (1995).

Bradlow HL, Hershcopf RJ, Martucci CP, Fishman J. Estradiol 16 α -hydroxylation correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for hormonal etiology of breast cancer in human. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6295-6299 (1985).

Bukvic N, Bavaro P, Elia G, Cassano F, Fanelli M, Guanti G. Sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutat Res* 415:25-33 (1998).

Burgaz S, Erdem O, Karahalil B, Karakaya AE. Cytogenetic biomonitoring of workers exposed to bitumen fumes. *Mutat Res* 419:123-130 (1998).

Campbell, R. *Ecología Microbiana*. Limusa, 268 pag. México. (1987).

Calderon-Garciduenas L, Wen-Wang L, Zhang YJ, Rodriguez-Alcaraz A, Osnaya N, Villarreal-Calderon A, Santella RM. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ Health Perspect* 107:469-474 (1999).

Canales-Aguirre AA, De Celis R, Salado-Ponce H, Feria-Velasco A. Xenohormonas: Función y efectos. e-Gnosis. Aceptado para publicación (2002).

Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, Marconi F, Sgura A, Tanzarella C, Zijno A. Genetic effects of petroleum fuels. II: Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environ Mol Mutagen* 32:130-138 (1998).

Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204:379-406 (1988).

Chapalamadugu, S. y Chaudhry, G. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphate. *Critical Reviews in Biotechnology*. 12: 357-389 (1992).

Cicchetti R, Bari M, Argentin G. Induction of micronuclei in bone marrow by low pesticides and their differentiation with CREST staining: an in vivo Study. *Mut Res* 439:239-248 (1999).

Cochran WG, Cox, GM. *Experimental designs*, 2 nd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York (1957).

Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. Environ Health Perspect 74:3-9 (1987).

Colborn T, Clement C. Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Advances in modern environmental toxicology. 21. Princeton, NJ:Princeton Scientific Publishing (1992).

Colborn T, Dumanoski D, Myers PJ. Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? a scientific detective story, Penguin Books, New York, pp. 47-67 (1996).

Cremlyn, R. Pesticides, preparation and mode of action. John Wiley & Sons. N.Y., E.U.A p 360 (1979).

Cremlyn, R. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Limusa, p 356. México (1990).

Daniel WW. Bioestadística. base para el análisis de las ciencias de la salud. 3 ed. Ed. Limusa, México (1998).

Davis DL, Axelrod D, Osborne M, Telang N, Bradlow HL, Sittner E. Avoidable causes of breast cancer: the known, unknown, and the suspected. Ann N Y Acad Sci. 833:112-128 (1997a).

Davis DL, Breast cancer and the environment, World Resources (1999).

Davis DL, Bradlow, HL Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culvier H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. Environ Health Perspect 101:372-377 (1993).

Davis DL, Telang NT, Osborne MP, Bradlow HL. Medical hypothesis: bifunctional genetic-hormonal pathways to breast cancer. Environ Health Perspect.105: 571-576 (1997b).

Dawson-Saunders B, Trapp RG. Bioestadística médica. 2 ed. Ed. Manual Moderno, México (1999).

Dees C, Askari M, Garrett S, Gehrs K, Henley D, Ardies CM, Travis C. Estrogenic and DNA-damaging activity of red no. 3 in human breast cancer cells. *Environ Health* 105:625-632 (1997).

De ferrari M, Artuso M, Bonsái S, Bonatti S, Cavalieri D, Pescatore E, Marchini V, Pisano A, Abbondandolo A. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: Chromosome aberration and Sister chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. *Mut Res* 260:105-113 (1991).

Ekbom A, Hsieh CC, Lipworth L, Adami HQ, Trichopoulos D. Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 89:71-76 (1997).

Elledge RM, Clark GM. Tumor biologic factors and breast cancer prognosis among white, Hispanic and black women in The United States. *J Natl Inst.* 86:705-712 (1994).

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128 (1991).

Eubanks MW. Hormones and health. *Environ Health Perspect.* 105:482-487 (1997).

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 339:37-59 (1995).

Falck GCM, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 441:235-237 (1999).

Fishman J, Osborne MP, Telang NT. The role of estrogen in mammary carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 768:91-100 (1995).

Forni A. Chromosomal aberrations in monitoring exposures to mutagens-carcinogens, in: *IPCS Joint Symposia No. 7, 12-15 December 1983, Espoo, Finland. IARC Scientific Publications.* 52:325-337 (1984).

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-425 (1982).

Gail MH, Benichou J. Validation studies on a model for breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 86:573-575 (1994).

Gammon D, Wolff ME. Treatment of breast cancer and blood levels of chlorinated hydrocarbons. *Cancer Epidemiology.* 6:327-332 (1997).

Gauthier JM, Dubeau H, Rassart E. Induction of micronuclei in vitro by organochlorine compounds in beluga whales skin fibroblasts. *Mutat Res.* 439:1 87-95 (1999).

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* 50: 7-33 (2000)

Goksory A, Förlin L. The cytochrome P 450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat Toxicol* 22:287-312 (1992).

Goldin BR, Gorbach SL. Effect of diet on the plasma levels, metabolism and excretion of estrogens. *Am J Nutrition* 48:787-790 (1988).

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250:1684-1689 (1990).

Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 5:358-364 (1987).

Hampton JW, Maher JF. Pedigree analysis of breast cancer in Oklahoma indian woman. *Cancer*. 83:1796-1799 (1998).

Han X, Liehr JG. Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis* 16:2571-2574 (1995).

Hansen AM, Wallin H, Wilhardt P, Knudsen EL. Monitoring urban air exposure of bus drivers and mail carriers in Denmark. En: *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases* (Chiyotani K, Hosoda Y, Aizawa Y, eds). Amsterdam: Elsevier Science 1055-1060. (1998).

Harris JR, Lippman ME. Breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 327:319-28 (1992).

Harte J. Guía de las sustancias contaminantes. El libro de los toxicos de la A a la Z., Editorial Grijalbo, México, (1995).

Hartmann A., Fender H., Speit G. Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the Comet (single-cell gel) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 32:17-24 (1998).

Helma C, Uhl M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat Res.* 466:9-15 (2000).

Hemminki K, Dickey C, Karlsson S, Bell D, Hsu YZ, Tsai WY, Mooney LA, Savela K, Perera FP. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis* 18:345-350 (1997).

Huang YL, Sep JY, Lin TH. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clinical Biochemistry.* 32:131-136 (1999).

Hunter DJ, Hankinson SE, Laden F, Colditz GA, Manson JE, Willett WC, Speizer FE, Wolff MS. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 337:1253-1258 (1997).

INEGI Anuarios Estadísticos de los estados de Jalisco, Michoacán, Colima y Nayarit (1999).

Jensen RG, Lammi-Keefe CJ y Koletzko B Representative sampling of human milk and the extraction of fat for analysis of environmental lipophilic contaminants. *Toxicol Environ Chem* 62:229-247 (1997).

Johansson M Effects of aryl methyl sulfones on the glucocorticoid homeostasis. Licentiate Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Department of Pharmacology & Toxicology. (1998).

Jönsson C, Lund BO, Bergman A, and Brandt I. Adrenocortical toxicity of 3-methylsulphonyl-DDE; 3: studies in fetal and suckling mice. *Reprod Toxicol* 6:233-240b (1992).

Jönsson CJ ., Lund BO. In vitro bioactivation of the environmental pollutant 3-methylsulphonyl-2,2-bis (4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene in the human adrenal gland. *Toxicol Lett* 71:169-175 (1994).

Kalina I, Brezani P, Gajdosova D, Binkova B, Salagovic J, Habalova V, Mrackova G, Dobias L, Sram RJ. Cytogenetic monitoring in coke oven workers. *Mutat Res.* 417:9-17 (1998).

Karahalil B, Burgaz S, Fisek G, Karakaya AE. Biological monitoring of young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops. *Mutat Res.* 412:261-269 (1999).

Karuzina II, Archakov AI. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. *Free Radic Biol Med.* 16:73-97 (1994).

Kelly-Garvet F, Legator MS. Cytogenetic and mutagenic effects of DDT and DDE in a Chinese hamsters cell line. *Mut Rest.* 17: 223-229 (1973).

Klug TL, Bradlow Hl., Sepkovic DW. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for simultaneous quantitation of 2- and 16 alpha-hydroxyestrone in urine. *Steroids*. 59:648-655 (1994).

Kohlmeier L., Rehm J., Hoffmeister H. Lifestyle and trends in worldwide breast cancer rates. *Ann. NY Acad. Sci.* 609:259-269 (1990).

Kosary CL, Gloeckler Ries LA, Miller BA, Hankey BF, Harras A, Edwards BK, Cancer statistics review 1973-1991. eds. SEER. NIH Publ 94-2789. Bethesda, MD:National Cancer Institute, (1994).

Kouraskis A, Mouratidou M, Kokkinos G, Barbouti A, Kotsis A, Mourelatos D, Dozi-Vassiliades J. Frequencies of chromosomal aberrations in pesticides sprayers working in plastic green house. *Mut Res* 279:145- 148 (1992).

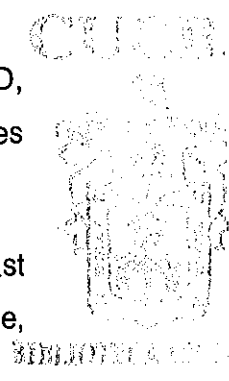
Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N. Breast Cancer and Serum Organochlorines: A Prospective study among white, black, and asian women,. *J Natl Cancer Inst.* 86:589-599 (1994).

Krishnan AV, Starhis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286 (1993).

Kuchenmeister F, Schmezer P, Engelhardt G. genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay. *Mutat Res.* 419:69-78 (1998).

Lea OA, Kvinnsland S, Thorsen T. Improved measurement of androgen receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 49:7162-7167 (1989).

Lebailly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemeney D, Godard T, Sichel F, LeTalaër JY, Henry-Amar M, Gauduchon P. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7:917-927 (1998).



Lewin B. Genes VII illustration (2001).

<http://www.oup.co.uk/best.textbooks/biochemistry/genesvii/illustrations/>
(2001).

Li D, Wang M, Dhingra K, Hittleman WN. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to cancer etiology. *Cancer Res* 56:287-293 (1996).

Li JJ, Li SA. Estrogen carcinogenesis in hamster tissues: a critical review. *Endocrine Rev* 11:524-531 (1990).

Liehr JG, Ricci MJ, Jefcoate CR, Hannigan EV, Hokanson JA, Zhu BT. 4-hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9220-9224 (1995).

Liehr JG, Ricci MJ. 4-hydroxylation of estrogens as marker for human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3294-3307 (1996).

Loft S, Poulsen HE, Vistisen K, Knudsen LE. Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers. *Mutat Res* 441:11-19 (1999).

Loman N, Johannsson O, Bendahl PO, Borg A, Ferno M, Olsson H. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer*. 83:310-319 (1998).

MacLachlan JA, Arnold SF. Environmental Estrogens. *Am J Sci*. 84:452-461 (1996).

MacIndoe JH, Etre LA. An antiestrogenic action of androgens in human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 53:836-842 (1981).

Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J Natl Cancer Inst.* 87:1681-1685 (1995).

Mahr U, Miltenburger HG. The effect of pesticides on chinese hamsters cell cultures. *Mutat Res.* 40:107-118 (1976).

MaKelvey-Martin, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. the single gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res.* 288:47-63 (1993).

Malins D. Identification of hydroxyl radical-induced lesions in DNA base structure: biomarkers with a putative link to cancer development. *J Toxicol Environ Health* 40:247-261 (1993).

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 424:83-95 (1999).

Masfaraud JF, Devaux A, Pfohl-Leskowicz A, Malaveille C, Monod G. DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo[a]pirene. *Toxic in Vitro* 6:523-531 (1992).

Mattison DR. The mechanisms of action of reproductive toxins. *Am J Ind Med* 4:265-279 (1983).

Medellín MP. Sustancias tóxicas vs sostenibilidad. *Pulso*, 4 (2002).

Meng Z, Zhang B. Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of workers at a phosphate fertilizer factory. *Mutat Res* 393:283-288 (1997).

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu QY, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate gene for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71 (1994).

Monterrosas, M. Biodegradación de paratión metílico, en medio acuoso y en suspensión de suelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 58 (1998).

Morse DC, Wehler EK, Wesseling W, Koeman JH, Brouwer A. Alterations in rat brain thyroid hormone status following pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). *Toxicol Appl Pharmacol* 136:269-279 (1996).

Muss HB. Treatment plans for black and white women with stage II node - positive breast. *Cancer*. 103:312-319 (1998).

Mosteller F, Tukey, J W. Data analysis, including statistics. En. Lindzey, G. and Aronson, E., (ed), *Handbook of Social Psychology*, Addison.

Nagel SC, vom Saal FS, Thayer, KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105:70-76 (1997).

Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3650-3657 (1995).

Nath RG, Cohen L, Li D, Ocando JE, Chung FL, Detection of exocytic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in mammary glands DNA of human and rats. *Proc AM Assoc Cancer Res*. 36:139-145 (1995).

OMS. DDT y sus derivados. *Criterios de Salud Ambiental* 9. Organización Mundial de la Salud, Ginebra (1982).

Ortega, C., Espinosa, T. y López, C. El Control de Riesgos para la Salud Generados por Plaguicidas Organofosforados en México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública de México* 36:624- 632. (1994).

Ortiz-Hernández. M, Sánchez-Salinas, E., Vázquez-Duhalt, R., Quintero-Ramírez, R. Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. *Biotecnología*. 3: 129-151 (1997).

OsborneMP, Bradlow HL, Wong GYC, Telang NT. Up regulation of estradiol C16 α -hydroxylation in human breast tissue: a potential biomarker for breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 85:1917-1920 (1993).

Oshimura M, Barret C, Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutag*, 8:129-159 (1986).

Oxford Biomedical Research. Colorimetric assay for lipid peroxidation. Product No. FR 12 (2001).

Palmer KA, Green S, Legator MS. Cytogenetics effects of DDT and derivatives of DDT in a cultured mammalian cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 22:355-364 (1972).

Parkin DM, Muir CS. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ*. 120:45-173 (1992).

Parry EM, Ballantine JA, Ellard S, Evans WE, Jones C, Kilic N, Lewis RI. Biomonitoring study of a group of workers potentially exposed to traffic fumes. *Environ Mol Mutagen* 30:119-130 (1997).

Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res* 441:115-127 (1999).

Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cells, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35 (1993).

Pujol P, Daures JP, Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer*. 83:698-704 (1998).

Rattner BA, Michael SD. Organophosphorus insecticide induced decrease in plasma luteinizing hormone concentration in white-footed mice. *Toxicol Lett* 24:65-69 (1985).

Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res.*32:71-110 (1992).

Rita P, Reddy PP, Vancatram RS, Monitoring of workers exposed to pesticides in grape garden of Andhra Pradesh. *Environ Res* 44:1-5 (1987).

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Sex hormone binding globulin: binding to cell membrane and generation of a second messenger. *J Androl* 3:101-106 (1992).

Sabbioni G. Neumann HG. Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of Urea and Carbamate pesticides. *Carcinogenesis* 11:111-115 (1990).

Shakar D, Sharma A, Talukder G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow. *Mut Res* 301:33-38 (1993).

Schneider J., Kinne D., Fracchia A., Pierce V., Anderson K.E., Bradlow H.L., Fishman J. Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer *Proc Natl Acad Sci.* 79:3047-3051 (1982).

Sekihashi K, Yamamoto a, Matsumura Y, Ueno S, Watanabe-Akanuma M, Kassie F, Knasmüller S, Tsuda S, Sasaki Y. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat Res* 517:53-74 (2002).

Secretaria de Salud Jalisco. Registro Estatal de Cancer. Jalisco 1998. *Boletin de Estadistica* No. 25. (1998).

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells *Exp. Cell Res.* 175:184-191 (1988).

Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-Lopez MD. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem* 41:1888-1895 (1995).

Sorsa M. Monitoring of Sisters Chromatid Exchange and micronuclei as biological endpoints. IPCS, IARC Scientific Publication, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 52:325-337 (1984).

SSA. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. DGE-SSA (1997).

Suto A, Bradlow HL, Wong GYC, Osborne MP, Telang NT. Experimental down-regulation of intermediate biomarkers of carcinogenesis in mouse mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 27:193-202 (1993).

Surrallés J, Autio K, Nylund L, Jarventaus H, Norppa H, Veidebaum T, Sorsa M, Peltonen K. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis* 18:817-823 (1997).

Srám R.J., Rossner P., Peltonen K., Podrazilova K., Mrackov G., Demopoulus N.A., Stephaunou G., Vlanchodimitropoulus D., Darroudi F., Bates A.D. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges (SCE), cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3-butadiene exposed workers. *Mutat. Res.* 419:145-154 (1998).

Swaneck G.E., Fishman J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:7831-7835 (1988).

Telang NT. Oncogenes, estradiol biotransformation and mammary carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 784:277-287 (1996).

Telang NT, Suto A, Wong GY, Osborne MP, Bradlow HL. Induction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant

proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 84:634-638 (1992).

Telang NT, Suto A, Wong GY, Bradlow HL, Osborne MP. Genotoxic damage and aberrant proliferation by estrogen metabolites in mammary epithelial cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 33:278 (1992).

Thomas BS, Bullbrook RD, Harward JL. Urinary androgen metabolites and recurrence rates in early breast cancer. *Eur J Clin Oncol* 18:447-451 (1982).

Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Paternack BS. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in post-menopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87:190-197 (1995).

Torres-Bugarin O, De Andas-Casillas S, Ramirez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM., Zuñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in bucal mucuosa. *Mutat. Res.* 413:277-281 (1998).

Trenz K, Rothufuss A, Schütz P, Speit G. Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat Res* 500:89-96 (2002).

Trush MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative estress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 10:201-209 (1991).

Tsutsui T., Barrett C. Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogen-like chemicals. *Environ. Health Perspect.* 105:619-624 (1997).

Tuker JD, Preston RJ. Chormosome aberrations, micronuclei, aneuploidy sister chromatide exchanges, and cancer risk assessment. *Mut Res.* 365:147-159 (1996).

Vaghef H, Nygren P, Edling C, Bergh J, Hellman B. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat Res.* 395:127-138 (1997).

Vaino H. Molecular approaches in toxicology: change in perspective. *J. Occup Environ Med* 37:14-18 (1995).

Valverde M, Carmen-López M, López I, Sánchez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individual exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen* 30:147-152 (1997).

Valverde M Ostrosky-Wegman P, Rojas E, Fortoul T, Meneses F, Ramírez M, Díaz-Barriga F, Cebrian M. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Publica de México.* 41:109-113 (1999).

Van Damme K, Casteleyn L, Heseltine E, Huici A, Sorsa M, Van Larebeke N, Vineis P. Individual susceptibility and prevention of occupational disease: Scientific and Ethical issues. *J Occup Environ Med.* 37:91-99 (1995).

Vega de Leon S. Los Plaguicidas Organoclorados en México. Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-Xochimilco. (1992).

Vejarano F. Amenaza Global. Cuaderno ciudadano sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, RAPAM (2000).

Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S y Rodriguez A. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (comet assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology* 130:129-139 (1998).

Vine MF, Stein L, Weigle K, Schroeder J, Degnan D, Tse CK, Hanchette C, Backer. Effects on the immune system associated with living near a pesticide dump site. *Environ Health Perspect* 108:12 1113-24. (2000).

Walker CH. Biochemical responses as indicators of toxic effects of chemicals in ecosystem. *Toxicol. Lett* 64:527-533 (1992).

Wang MY, Dhingra K, Hittleman WN,. Peroxidation induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5:705-710 (1996).

Wang WG, Wang SH, Xue YC, Zhen YS. Effect of the conjugate composed of a human monoclonal antibody and pingyangmycin on mammary cancer. *Yao Xue Xue Bao.* 30:8583-8587 (1995).

Weisz J, Bui QD, Roy D, Liehr JG. Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens. *Endocrinology* 131:655-661 (1992).

Whitten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:82-86 (1995).

Whitten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. *Steroids* 59:7 443-449 (1994).

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265:2088-2090 (1994).

World Health Organization. Recommended Classification of Pesticides by Hazard WHO Chronique, 29:397-401(1975).

WHO guidelines for de study of genetic effects in human populations. Environmental Health criteria 46. World Health Organization, Geneva, (1985).

WHO/IPCS. Environmental Health Criteria 1555. Biomarkers and Risk Assessment. Concepts and Principles. Geneva: World Health Organization, (1993).

Yoder J, Watson M, Benson WW. Lymphocytes chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. Mut Res 21:335-340 (1973).

Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu_Williams AH, Kolonel LN, Horn_Ross PL, Rosenthal JF. Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. , J Natl Cancer Inst. 85:22 1819-1827 (1993).

ANEXO FOTOGRÁFICO



Foto 1. DDT grado reactivo 98 % de pureza de la marca Sigma, utilizado durante la fase de exposición.

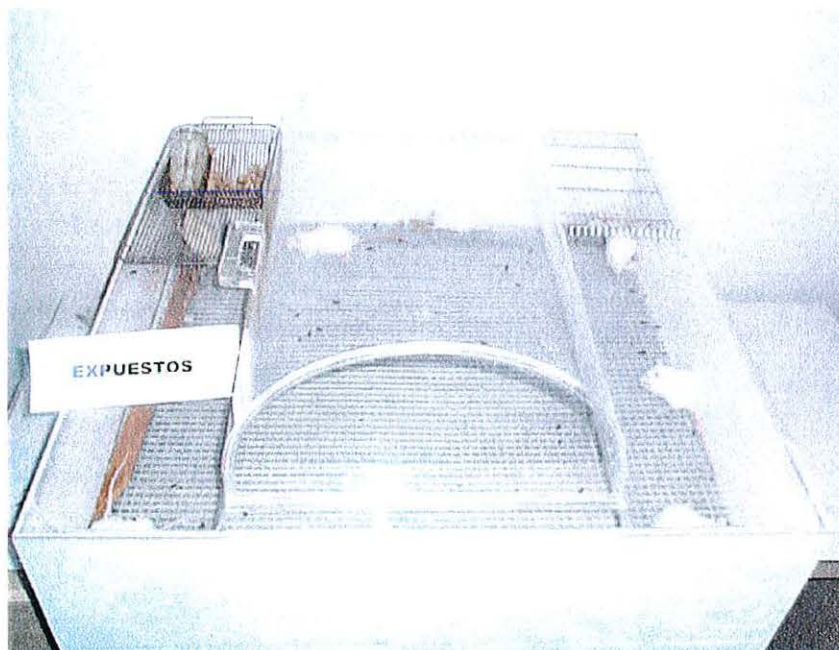


Foto 2. Grupo de animales expuestos a DDT durante 5 meses.

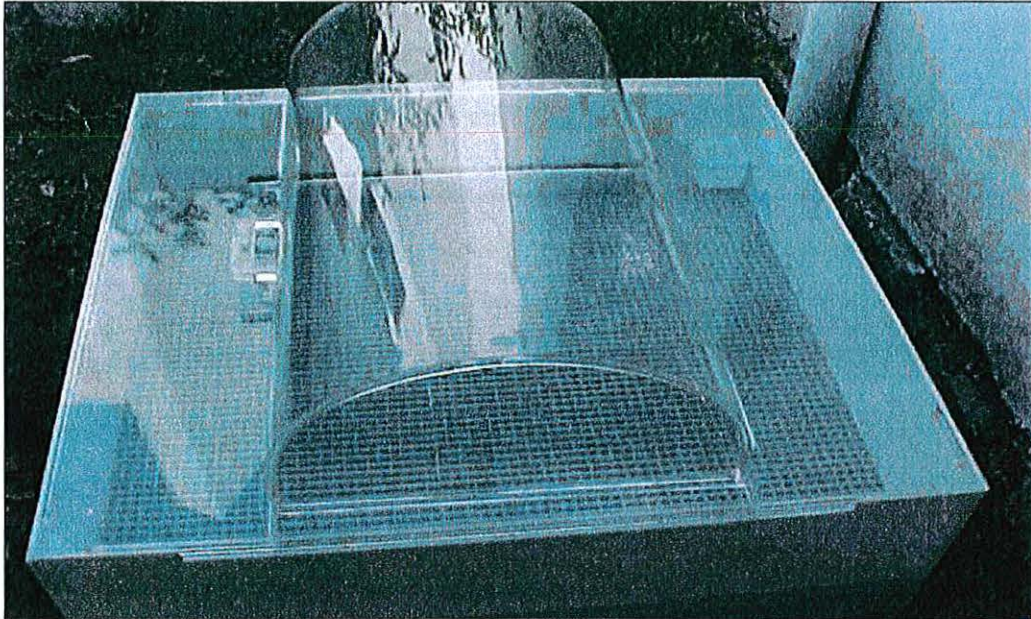


Foto 3. cámara de exposición diseñada para este estudio.

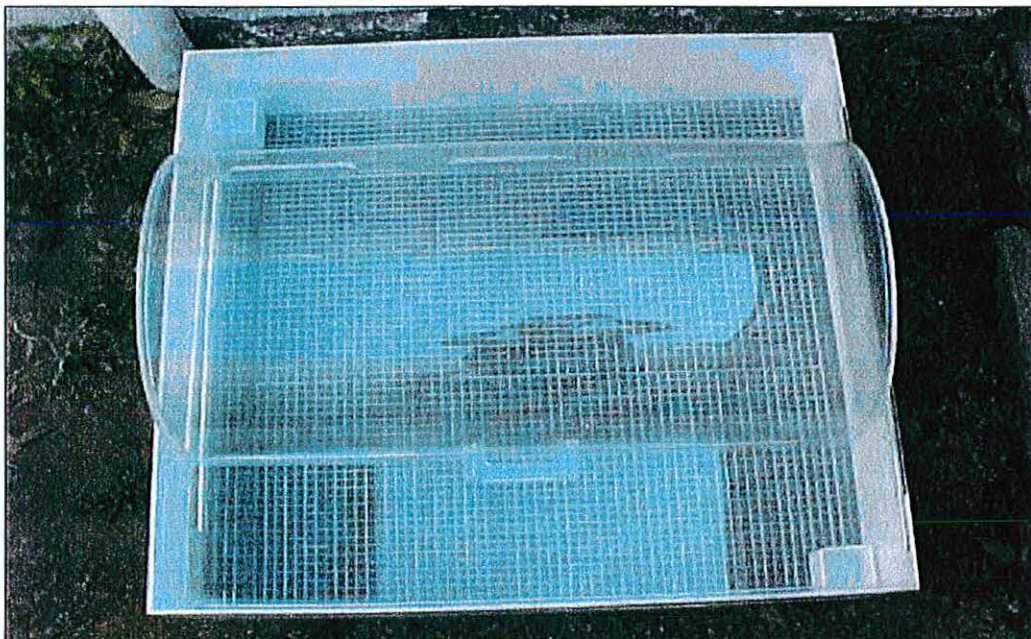


Foto 4. Vista aérea de la cámara de exposición diseñada para este estudio.

CUCBA



BIBLIOTECA CUCBA

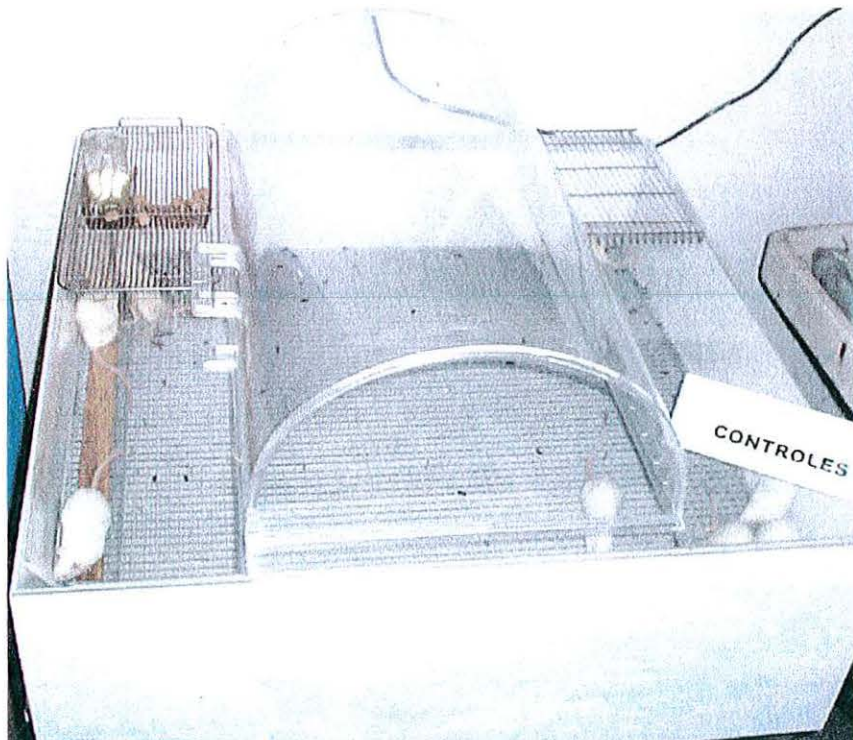


Foto 5. Grupo de animales control, expuestos a etanol utilizado como vehículo.



Foto 6. Obtención de muestra sanguínea mediante punción de la vena caudal.

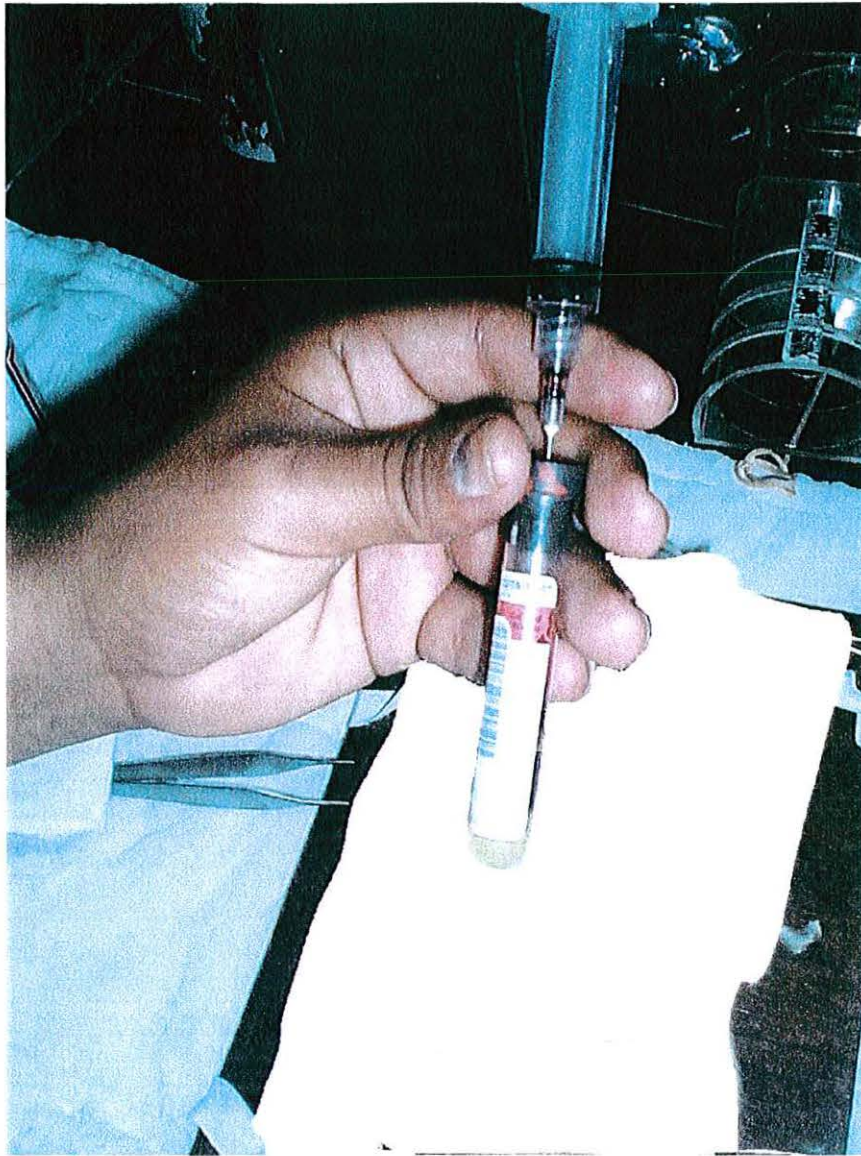


Foto 7. Colocación de muestra sanguínea en tubos vacutainer.