

Determinación del daño genotóxico de niños en relación a las mujeres en edad reproductiva por exposición a plomo y arsénico en Alto Lima - La Paz

ASCARRUNZ M. E.¹
TIRADO N.

1.2. Instituto de Genética Humana
Facultad de Medicina
Universidad Mayor de San Andrés
maueascarrunz17@yahoo.com

Palabras Clave:

Genotoxicidad, Antiviral, Planta medicinal,
Test de Mutación y Recombinación
Somática (SMART)

Key words:

Genotoxicity, Antiviral, medicinal Plants,
Somatic Recombination and Mutation Test
(SMART)

RESUMEN

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición ocupacional o accidental al plomo está asociada con una incidencia mayor a tumores renales y cáncer de pulmón y estómago. Estudios *in vivo* mostraron un aumento de aberraciones cromosómicas y frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH) en linfocitos de trabajadores expuestos a plomo, disminución de la fidelidad de la síntesis o reparación del ADN.

Se determinaron las concentraciones de plomo en sangre, frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH), índice de proliferación celular (PRI), frecuencia de micronúcleos en células binucleadas (MNBN) e índice de división nuclear (IDN), en una población de 59 niños y 62 mujeres en edad reproductiva expuesta a metales pesados.

El análisis comparativo de las pruebas genotóxicas en los niños, mostró un incremento significativo en la frecuencia de MN ($6,67 \pm 2,81$) en relación al aumento en la concentración de plomo en sangre ($11-44 \text{ ug/dl}$). Se ha evidenciado que las mujeres en edad reproductiva tienen mayor frecuencia de ICH ($17,24 \pm 1,00$) en relación a los niños $13,07 \pm 0,68$, y los niños tienen mayor daño clastogénico ($3,63 \pm 0,65$) que las mujeres ($2,91 \pm 0,32$). Estos resultados muestran una clara evidencia de que el plomo ocasiona efectos clastogénicos en los niños y las mujeres de Alto Lima expuestos a metales pesados.

RESUMEN

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición ocupacional o accidental al plomo está asociada con una incidencia mayor a tumores renales y cáncer de pulmón y estómago. Estudios *in vivo* mostraron un aumento de aberraciones cromosómicas y frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH) en linfocitos de trabajadores expuestos a plomo, disminución de la fidelidad de la síntesis o reparación del ADN.

Se determinaron las concentraciones de plomo en sangre, frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH), índice de proliferación celular (PRI), frecuencia de micronúcleos en células binucleadas (MNBN) e índice de división nuclear (IDN), en una población de 59 niños y 62 mujeres en edad reproductiva expuesta a metales pesados.

El análisis comparativo de las pruebas genotóxicas en los niños, mostró un incremento significativo en la frecuencia de MN ($6,67 \pm 2,81$) en relación al aumento en la concentración de plomo en sangre ($11-44 \text{ ug/dl}$). Se ha evidenciado que las mujeres en edad reproductiva tienen mayor frecuencia de ICH ($17,24 \pm 1,00$) en relación a los niños $13,07 \pm 0,68$, y los niños tienen mayor daño clastogénico ($3,63 \pm 0,65$) que las mujeres ($2,91 \pm 0,32$). Estos resultados muestran una clara evidencia de que el plomo ocasiona efectos clastogénicos en los niños y las mujeres de Alto Lima expuestos a metales pesados.

INTRODUCCIÓN

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición ocupacional o accidental al plomo está asociado con una incidencia mayor a tumores renales y cáncer de pulmón y estómago. En varios estudios *in vivo* mostraron un aumento de aberraciones cromosómicas y frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH) en linfocitos de trabajadores expuestos a plomo¹. Utilizando células humanas expuestas a plomo *in vitro* han sugerido que los iones plomo disminuyen la fidelidad de la síntesis o reparación del ADN². El deterioro del ADN y los efectos genotóxicos pueden ser magnificados cuando la reparación es inhibida, como se demostró en un estudio sobre la inducción de ICH por LUV en células expuestas a diferentes niveles de plomo³⁻⁶.

Lerda, 1994, reportó que el grupo expuesto a arsénico tuvo un promedio significativamente elevado de ICH/célula de $10.46 \pm 1.02 \text{ SD}$, versus 7.49 ± 0.97 en el grupo control.

Por otro lado, como individuos en desarrollo, pueden expresar susceptibilidad aumentada a agentes ambientales peligrosos, debido a las diferencias en la absorción, metabolismo, distribución y excreción de mutágenos. Esta hipótesis está ampliamente soportada por estudios epidemiológicos, los cuales reportan aumento en la incidencia de cáncer en niños y por datos experimentales que muestran un riesgo de cáncer en roedores expuestos *in útero* a carcinógenos comparado con la exposición a la edad adulta⁷.

En Bolivia se han realizado estudios de detección de plomo en sangre de niños y mujeres en edad reproductiva en la población de Alto Lima situada al norte de la ciudad de El Alto, de la provincia Murillo del Departamento de La Paz, debido a la presencia de fábricas metalúrgico urbanizadas (Carbol, Hormen y Bustos) de producción de calaminas, refinación de plomo y estaño y concentrados de wólfram que son fundidos y refinados para producir material de alta ley y cuyo contenido de arsénico puede llegar al 4.0 %, que han puesto en peligro a niños, mujeres en edad reproductiva y a toda la población que vive en ese distrito, debido a que el lugar focal de contaminación se encuentra cerca de viviendas y escuelas. Entre los residuos de la empresa se contabilizan casi dos mil toneladas de los residuos de la tostación. Un análisis de dichos residuos establece entre otros elementos, la presencia de azufre 17.0%, zinc 8.1 %, cobre 2.7%, arsénico 0.7% y plomo 0.2%.

La fábrica Bustos que produce arsénico lleva laborando 48 años, Hormet que es la refinadora de plomo tiene una antigüedad de 36 años y Calbol que produce calaminas utilizando zinc, cromo y plomo, cuenta ya con 30 años de trabajo. Actualmente estas fábricas se encuentran clausuradas, sin embargo, los desechos tóxicos se encuentran al aire libre y por lo tanto se señala la existencia de tres rutas completas. De ellas, el suelo sería la de mayor importancia, sin descartar al adobe, al aire y al agua. Las partículas pesadas pueden viajar del aire al suelo y por los vientos, del suelo al interior residencial incluyendo las escuelas que se encuentran próximas a las fábricas citadas⁸.

Fernando Díaz-Barriga y col. (8), determinaron que el nivel promedio de plomo en niños fue de $7,5 \pm 1.04 \text{ ug/dl}$, sin embargo, mostraron que más del 40 % de los niños estudiados superó el límite de seguridad de 10 ug/dl , principalmente los del grupo etáreo entre 5-7 años. Así mismo, determinaron que la concentración de arsénico en orina fue de $55.0 \pm 1.1 \text{ ug/g creatinina}$.

En un primer estudio, se realizó la evaluación del daño genotóxico en niños expuestos a metales pesados en esta población. El análisis comparativo de las pruebas genotóxicas, mostró un aumento significativo en la frecuencia de MN en células binucleadas en relación al nivel de exposición al plomo, al igual que el índice de división nuclear. Esto es una clara evidencia de que el plomo ocasiona efectos clastogénicos y aneugénicos en los niños expuestos a metales pesados. Lo mismo ocurre con

la frecuencia de MN en células con más de dos núcleos (tri y tetranucleadas) con relación a la concentración de plomo.

Una vez evaluado el daño genotóxico en los niños, nos interesa saber si ellos tienen mayor daño genotóxico que las mujeres en edad reproductiva, considerando que el metabolismo y desarrollo morfológico y funcional es diferente, para evaluar la eficiencia de los sistemas de detoxificación en ambos grupos expuestos en las mismas condiciones.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La exposición a plomo y arsénico producirá mayor daño genotóxico en los niños en relación a las mujeres en edad reproductiva de Alto Lima-La Paz?

OBJETIVO GENERAL

Relacionar el daño genotóxico por exposición a plomo y arsénico en niños con mujeres en edad reproductiva de Alto Lima-La Paz

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el nivel de daño primario al DNA en niños y mujeres mediante la prueba de Intercambio entre Cromátides Hermanas en cultivo de linfocitos.
2. Establecer el nivel de daño clastogénico en niños y mujeres, mediante la prueba de Micronúcleos en células binucleadas
3. Comparar el daño genotóxico con la concentración de plomo sanguíneo y otros factores de riesgo.

CUADRO No. 1

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO EN NIÑOS DE ALTO LIMA

Variable n = 59	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Sexo			
Femenino	35	60,3	60,3
Masculino	23	39,7	22,9
Grado de instrucción			
Preescolar	5	9,6	100,0
Primaria	41	78,8	88,5
Secundaria	6	11,5	100,0
Exposición			
No Expuestos	29	49.2	49.2
Expuestos	30	50.8	100.0

4. Determinar el daño genotóxico de niños en relación a las mujeres por exposición a plomo y arsénico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

- Diseño: Descriptivo correlacional
- Muestreo Aleatorio simple. Tamaño de la muestra: 59 niños de ambos sexos y 62 mujeres en edad reproductiva, residentes en la sección II y III de Alto Lima de la ciudad de El Alto. Calculado con Statcalc- Epi-info 2002

CUADRO No. 2

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO EN MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA DE ALTO LIMA

Variable n = 62	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Estado civil			
Solteras	29	46.8	46.8
Concubinas	11	17.7	64.5
Casadas	20	32.3	96.8
Viudas	1	1.6	98.4
Divorciadas	1	1.6	100.0
Grado de instrucción			
Primaria	49	79.0	79.0
Secundaria	12	19.4	98.4
Universitaria	1	1.6	100.0
Ocupación			
Ama de casa	40	64.5	64.5
Comerciante	8	12.9	77.4
Artesana	6	9.7	87.1
Estudiante	4	6.5	93.5
Otras	4	6.5	100.0
Exposición			
No Expuestas	38	61.3	61.3
Expuestas	24	38.7	100.0
Consumo de tabaco			
Fumadora	31	50.0	50.0
No fumadora	31	50.0	100.0
Consumo de alcohol			
Rara vez	20	32.3	32.3
No consume	42	67.7	100.0

CUADRO No. 3

MICRONÚCLEOS POR NIVEL DE PLOMO EN SANGRE

PLOMO mg/dl	MNBN/1000 células
7 – 10 mg/dl	2,31 ± 0,66
11 – 44 mg/dl	6,67 ± 2,81

U de Mann-Whitney $p < 0.05$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5. Antes del análisis de comparación de grupos se verificó la distribución normal a través de la prueba de Kolmogorov Smirnov. Para probar la media de intercambio entre cromátides hermanas y micronúcleos con el valor basal referido en la literatura, se utilizó la prueba de comparación de medias o t para una muestra. Para la comparación de medias de grupos independientes se utilizó la prueba de U de Mann Whitney para los parámetros de daño genotóxico que no siguieron una distribución normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La edad promedio de los niños fue de 8.27 ± 3 años, con un rango de 2 a 14, una mediana de 8 y moda de 9. El tiempo de residencia en Alto Lima es $6,2 \pm 3,5$ años con un mínimo de 4 meses y un máximo de 14 años.

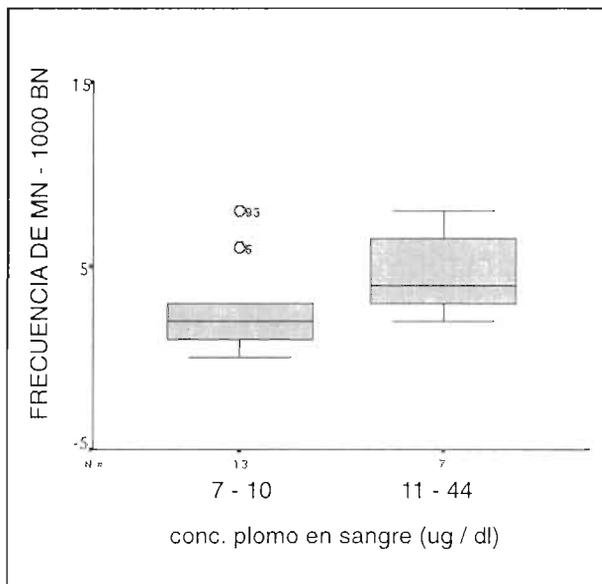
La edad promedio de las mujeres fue de 29 ± 7 años, un tiempo de residencia promedio de 6.8 años. El 50% son fumadoras y el 32.3 % consume bebidas alcohólicas rara vez (Cuadro No. 2)

En el Cuadro No. 3 y Figura No. 1, podemos observar que la frecuencia de micronúcleos difiere significativamente con la concentración de plomo con un nivel de confianza del 95%, lo que quiere decir que a mayor concentración de plomo, los niños tienen mayor daño clastogénico.

El Cuadro No. 4 y Figura No. 2 muestran la comparación de medias de la frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas entre niños y mujeres en edad reproductiva de la misma zona de exposición. Se puede observar que los niños presentan una frecuencia menor de ICH en relación a las mujeres, calculada a través de la prueba de U Mann Whitney. Por lo que podemos sugerir que las mujeres presentan mayor daño primario que los niños. Lo mismo podemos mostrar con el % de células con alta frecuencia de intercambios con una significancia estadística de $p < 0.05$ (Figura No. 3)

FIGURA No. 1

COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y CONCENTRACIÓN DE PLOMO (UG/DL) $P < 0.05$ U DE MANN-WHITNEY.

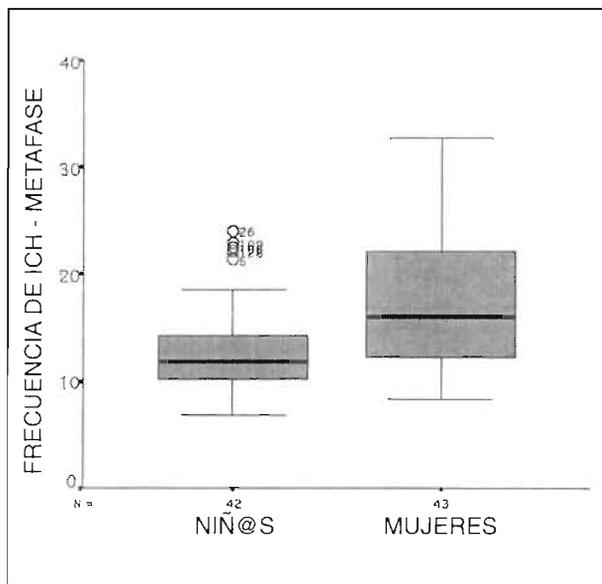


En relación al índice de proliferación celular los niños presentan un mayor retraso en la división celular que las mujeres ($p < 0.05$) (Figura No. 4)

Con relación a la frecuencia de MN, no existe una diferencia significativa entre niños y mujeres en edad reproductiva. (Cuadro No. 4).

FIGURA No. 2

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDES HERMANAS EN NIÑOS Y MUJERES. $P < 0.05$ U MANN WHITNEY.



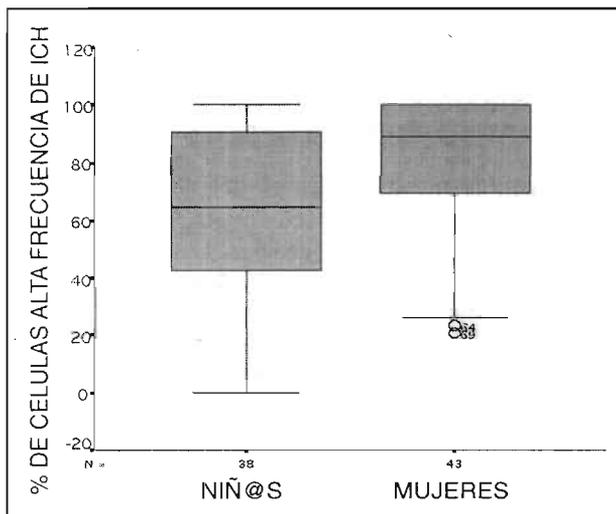
CUADRO No. 4
COMPARACIÓN DE VALORES PROMEDIO ± ES DE PARÁMETROS DE DAÑO GENOTÓXICO EN NIÑOS Y MUJERES EN EDAD FÉRTIL.

VARIABLE	NIÑOS 2 - 14 años			MUJERES 15 - 48		
	Prom. ± ES	V. min.	V. Max	Prom. ± ES	V. min.	V. Max
Plomo (ug/dl)	12,84 ± 1,77	7,20	44,0	-	-	-
Nº ICH/célula*	13,07 ± 0,68	6,80	24,03	17,24 ± 1,00	0,00	32,7
PRI*	2,14 ± 0,07	1,19	2,89	1,92 ± 0,07	0,55	2,74
% HFC*	62,18 ± 4,89	0,00	100	81,04 ± 3,67	0	100
MNBN/1000 cels.	3,63 ± 0,65	0,00	20,0	2,91 ± 0,32	0	8,00
IDN	1,40 ± 0,04	0,93	2,23	1,47 ± 0,04	1,10	2,00

ICH: Intercambios entre cromátides hermanas, % HFC: % de células con alta frecuencia de intercambios, MNBN: Micronúcleos en 1000 células binucleadas, IDN: Índice de división nuclear

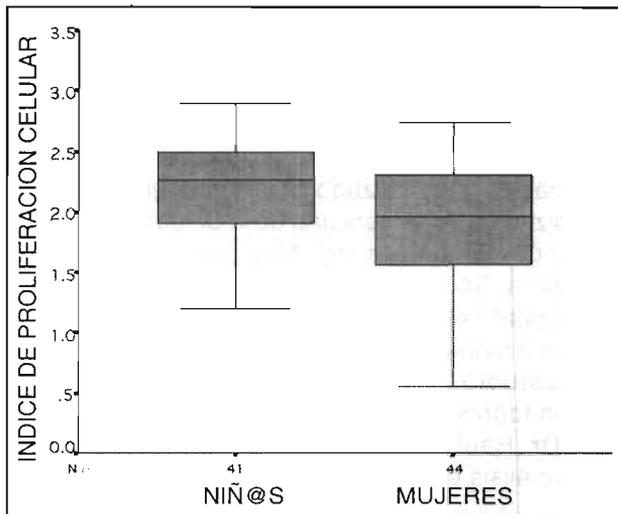
(*) p < 0.05 U de Mann-Whitney

FIGURA No. 3
COMPARACIÓN DE MEDIAS DE % DE CÉLULAS CON ALTA FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS EN NIÑOS Y MUJERES. P<0.05 U MANN WHITNEY



Analizando el comportamiento general de ambos grupos podemos afirmar que el plomo y otros metales pesados provocan daño al ADN y producen inicialmente daño genotóxico, ya sea daño primario o clastogénico. Los niños pueden tener mayor riesgo ya que están expuestos a estos contaminantes ocasionando acumulación de mutaciones durante el transcurso de toda su vida. Esta situación podría revertirse si se tomaran acciones de remediación en la zona, ya que la persistencia de la contaminación podría provocar que las mutaciones se fijen y producir daño irreversible en el ADN que

FIGURA No. 4
COMPARACIÓN DE MEDIAS DE ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN NIÑOS Y MUJERES P<0.05 U MANN WHITNEY.



en el futuro puedan generar enfermedades crónico-degenerativas.

CONCLUSIONES

Se determinaron las concentraciones de Pb en sangre y la frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH), índice de proliferación celular (PRI), frecuencia de micronúcleos en células binucleadas (MNBN) e índice de división nuclear (CBPI), en una población de niños y mujeres en edad reproductiva expuesta a metales pesados con

estructura étnica y ubicación geográfica igual a la población expuesta.

El análisis comparativo de las pruebas genotóxicas en la población de niños, mostró un incremento significativo tanto en la frecuencia de ICH y MN en células binucleadas en relación a la exposición al plomo. Esto es una clara evidencia de que el plomo ocasiona efectos clastogénicos y aneugénicos en los niños expuestos a metales pesados. Si bien los valores encontrados muestran daño genotóxico, se ha evidenciado que las mujeres en edad reproductiva tienen mayor daño en relación a los niños.

En comparación a un valor hipotético de la literatura, se ha evidenciado que los valores encontrados en nuestro estudio son mayores a los hallados por otros autores, sin embargo, es necesario caracterizar mejor la exposición para verificar si hay mayor daño genotóxico o se debe a las características particulares de la población que vive a 4000 m.s.n.m. y podría influir en estos hallazgos otros factores como agentes que interactúan con el ADN.

Las pruebas de ICH y MN en células binucleadas pueden ser utilizadas como indicadores de daño cromosómico y han demostrado ser útiles como biomarcadores de exposición a metales pesados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con la cooperación de la Organización Panamericana de la Salud, la dirección de Medio Ambiente del Ministerio de Salud y Previsión Social. A la Dra. Herminia Monrroy, profesional del Centro Médico de Alto Lima y a las madres y niños que participaron voluntariamente en este estudio. Finalmente, agradecemos a los coordinadores de la Dirección de Postgrado y al Prof. Dr. Raúl López Fernández por colaborarnos en el análisis estadístico de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mut. Res.* 2003 Sep 9; 540(1):19-28.
- Vaglenov A, Creus A, Laltchev S, Petkova V, Pavlova S, Marcos R. Occupational Exposure to Lead and Induction of Genetic Damage. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 3
- Pérez-Herrera N, Ceballos-Quintal J, Pinto-Escalante D. Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición agentes clastogénicos. *Rev Biomed* 1999; 10:71-76
- Díaz-Barriga F. Evaluación de los riesgos en salud por la exposición a metales pesados en La Paz, Bolivia. Informe entregado al Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud de la OPS-OMS 1992.
- P. Perry, S. Wolff, New Giemsa method for differential staining of sister chromatids; *Nature* 1974; 251: 156-158.
- Carrano AV, Moore D. H. The rationale methodology for quantifying sister-chromatid exchanges in humans Heddie J. A. eds. . *New Horizons in Genetic Toxicology*, 99: 267-304, Academic Press New York 1982.
- Ascarrunz M.E., Olivares J., Taboada G., Romero L. M. Evaluación del potencial genotóxico de 4 extractos vegetales de la medicina tradicional boliviana: *Chaetothylax boliviensis*, *Guetarda acreana*, *Heliocarpus americanus* y *Solanum americanum*. *BIOFARBO* 1999; 7 (7): 57-66
- Tirado B.N., Carvajal S. R., Romero F. L. M., Efectos genotóxicos y antigenotóxicos de la savia de *Croton Draconoides*. *BIOFARBO* 2000; 8(8): 71-76.
- Tirado N, Navia M.P, Cuti M. Pesquisa de daño genotóxico en personal médico y paramédico del Hospital Obrero N°1. *Cuadernos del Hospital de Clinicas* 2002; 47 (2) : 33-40.
- Michael Fenech a, Stefano Bonassi b,_, Julie Turner a, Cecilia Lando b, Marcello Ceppi b, Wushou Peter Changc, Nina Holland. *Mutation Research* 2003; 534: 45-64.
- DQ Wu, Y Wu. Micronucleus and sister chromatid exchange frequency in endemic fluorosis 1995; 28 (3): 125-127.
- Neri M, Fucic A, Knudsen L, Lando C, Merlo F, Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review *CUT. Res.* 2003; 544: 243-254