



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**GENOTOXICIDAD EN POBLACIONES INFANTILES  
EXPUESTAS A HIDROCARBUROS POLICICLICOS  
AROMATICOS (HPA's) EN LA ATMOSFERA DEL  
ESTADO DE TABASCO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

**PRESENTA**

**M.C. MA. TERESA GAMBOA RODRIGUEZ**

**DIRECTORES DE TESIS: DR. HUMBERTO BRAVO ALVAREZ**

**DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET**

**MÉXICO, D.F.**

**DICEMBRE 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Porque cada día es un comienzo nuevo.  
Porque esta es la hora y el mejor momento,  
nunca es tarde.....*

# I N D I C E

	<b>Pag</b>
<b>INDICE</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>1.- INTRODUCCION</b>	<b>13</b>
<b>2.-DEFINICION DEL PROBLEMA</b>	<b>18</b>
<b>2.1.- Objetivos</b>	<b>20</b>
<b>2.2.- Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>2.3.- Metas</b>	<b>22</b>
<b>3.-ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
<b>4.- MARCO TEORICO</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Estructura, Propiedades y Toxicidad de los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's)</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Riesgos a la Salud</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Metabolismo de los HPA's</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Técnicas de Monitoreo y Medición de HPA`s en el Aire</b>	<b>36</b>
<b>4.5. Biomarcadores: Indicadores de daño genético</b>	<b>38</b>
<b>5.- METODOLOGIA</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Descripción del área de estudio</b>	<b>43</b>
<b>5.1.1. Comunidad de Gregorio Méndez 1ª Secc., Comalcalco, Tabasco:</b>	<b>44</b>
<i>a) Fuentes de emisión.</i>	
<i>b) Parque Vehicular.</i>	
<i>c) Vientos dominantes.</i>	
<b>5.1.2. Comunidad de Nuevo Torno Largo, Paraíso, Tabasco:</b>	<b>45</b>
<i>a) Fuentes de emisión.</i>	
<i>b) Parque Vehicular.</i>	
<i>c) Vientos dominantes.</i>	

5.1.3. Comunidad de San Miguel 1ª Secc, Municipio de Reforma,	47
<i>Chiapas:</i>	
a) Fuentes de emisión.	
b) Parque Vehicular.	
c) Vientos dominantes.	
5.1.4. Comunidad de Netzahualcóyotl y Uquiná, Municipio de	49
<i>Balancán:</i>	
a) Fuentes de emisión.	
b) Parque Vehicular.	
c) Vientos dominantes.	
5.1.5. Colonia Las Gaviotas, Villahermosa, Municipio Centro,	
<i>Tabasco:</i>	50
a) Fuentes de emisión.	
b) Parque Vehicular.	
c) Vientos dominantes.	
5.2. Monitoreo de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en la Atmósfera	
del Área de estudio: Fase gas y Fase partícula	52
<i>Procedimiento para el muestreo de los HPA`s. Colección de la muestra:</i>	
5.2.1. Montaje y calibración del sistema de muestreo (TO-13); Equipo	52
<i>Hi-Vol y Ensamble del equipo</i>	
5.2.2. Materiales para la colección	53
5.2.3. Preacondicionamiento de Materiales para la colección de HPA`s:	
a) Filtros de Cuarzo (QFF).	54
b) Filtros de esponja de poliuretano (PUFF).	
5.2.4. Identificación y Cuantificación de HPA`s: Extracción,	
Concentración y limpieza de las muestras en fase gas/ fase	
<i>Partícula:</i>	55
a) Método de Sonicación: Limpieza-Extracción.	
b) Método de Rotavapor: Concentración de compuestos orgánicos.	
c) Limpieza de las muestras en fase gas y partícula de HPA`s.	

5.2.5. <i>Evaluación Analítica de HPA`S en fase partícula y fase gas (Método TO13, US-EPA, condiciones de operación del Cromatógrafo de gases).</i>	56
5.2.6. <i>Curva de Calibración para el análisis de HPA`s: cromatografía De Gases.</i>	57
5.2.7. <i>Análisis e Interpretación de Resultados: Cálculos:</i>	58
<i>a) Interpretación de Cromatogramas</i>	
<i>b) Volumen de la Muestra</i>	
<i>c) Concentración de HPA`s</i>	
5.3. <b>Monitoreo de linfocitos en sangre periférica en Infantiles:</b>	59
5.3.1. <i>Caracterización de la Población Infantil de estudio</i>	59
5.3.2. <i>Material Biológico</i>	62
5.3.3. <i>Cultivo celular en muestras de Linfocitos de sangre periférica de la población de estudio:</i>	63
<i>a) Aplicación de ensayo de Micronúcleos; Bloqueo de citocinesis</i>	
<i>b) Aplicación de ensayo de Cinética de Proliferación Celular; CPC, IM, IR</i>	
<i>c) Aplicación de ensayo Cometa; Electroforesis Unicelular en microgel</i>	
5.3.4. <i>Prueba de Micronúcleos (Fenech y Morley,1985):</i>	63
<i>a) Preparación de Laminillas</i>	
<i>b) Tinción de Laminillas</i>	
<i>c) Análisis de Laminillas</i>	
5.3.5. <i>Prueba de Cinética de Proliferación Celular</i>	65
<i>a) Preparación de Laminillas</i>	
<i>b) Tinción de Laminillas</i>	
<i>c) Análisis de Laminillas</i>	
5.3.6. <i>Prueba de Electroforesis unicelular (Ensayo Cometa):</i>	68
<i>a) Preparación de Laminillas</i>	
<i>b) Corrida de Electroforesis Unicelular de las Laminillas</i>	
<i>c) Análisis de Laminillas</i>	
<i>d) Determinación del grado de daño genotóxico ( Prueba de Viabilidad)</i>	

<b>5.4. Medición de los parámetros meteorológicos en los sitios de estudio: condiciones de velocidad y dirección del viento (Rosas de Viento), precipitación pluvial, periodo de muestreo.</b>	<b>70</b>
<b>5.5. Análisis estadístico (Stata versión 6.0) diferencias significativas entre los parámetros poblacionales y las concentraciones de HPA's.</b>	<b>71</b>
<b>6.- RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>73</b>
<b>6.1. Número de muestras obtenidas</b>	
<b>6.2. Medición de los Parámetros Meteorológicos en los sitios de estudio:</b>	<b>79</b>
<i>Velocidad y Dirección del Viento</i>	
<i>Precipitación y Humedad Relativa</i>	
<b>6.3. Concentración de HPA's por sitio de monitoreo</b>	<b>84</b>
<b>6.4. Daño Genotóxico en las poblaciones</b>	<b>104</b>
<b>7.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>130</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>133</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>151</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>153</b>

## **A N E X O S**

### **APENDICES**

- Apéndice A: Metabolitos urinarios del Benceno
- Apéndice B: Metabolismo del Benceno
- Apéndice C: Mapa del municipio de Comalcalco, Tabasco.
- Apéndice D: Mapa del municipio de Paraíso, Tabasco.
- Apéndice E: Mapa del municipio de Reforma Chiapas
- Apéndice F: Mapa del municipio de Balancan, Tabasco.
- Apéndice G: Mapa del municipio de Centro, Tabasco.
- Apéndice H: Simbología de los Mapas de Estudio
- Apéndice I: Procedimiento para la Calibración del Equipo Hi-Vol con el Rotámetro
- Apéndice J: Formato de Calibración para el Medidor Magnelético.
- Apéndice K: Rosas de Viento en el Periodo de Muestreo.
- Apéndice L: Encuesta Epidemiológica
- Apéndice M: Factores de riesgo en la población que resultaron con diferencias Significativas asociados a genotoxicidad ( $p < 0.05$ ).

### **FIGURAS**

- 4.1.A.- Estructura común de los anillos de HPA's.
- 4.1.A.1.- Muestreador típico de aire de alto volumen (Hi-Vol) modificado para HPA's.
- 5.1.A.- Mapa de localización de los Sitios de Muestreo en el Edo. Tabasco.
- 5.1.A.2.- Calibración Equipo de muestreo utilizando rootsmeter por medio de la transferencia a través de un punto crítico estándar.
- 5.1.A.3.- Calibración del flujo con el Medidor Magnelético del equipo de muestreo Hi-Vol Modificado.
- 5.1.A.4.- Estación de meteorología.
- 6.15.A.- Formación de micronúcleos.
- 6.1.5.B.- Tinción Diferencial FPG en metafases de linfocitos humanos en 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> división. (M1, MII y MIII).
- 6.15.C.- Metafase en Segunda División Celular M2 con ICH.
- 6.15.D.- Células de linfocitos con diferente grado de daño (Fragmentación del ADN).

### **GRAFICAS**

- 6.3.A- Condiciones de operación del equipo de muestreo (Hi-Vol) por Sitio de monitoreo.
- 6.13.1- Niveles de Riesgo para la Salud por exposición a Benzo (a) antraceno.
- 6.13.2- Niveles de riesgo para la salud por exposición a Benzo (a) pireno.
- 6.13.3- Niveles de riesgo para la salud por exposición a Benzo (b) fluoranteno.
- 6.13.4- Niveles de riesgo para la salud por exposición a Benzo (k) fluoranteno.
- 6.13.5- Niveles de riesgo para la salud por exposición a dibenzo (a, h) antraceno.

- 6.13.6.- Niveles de riesgo para la salud por exposición indeno (1, 2, 3, c, d) pyreno.
- 6.13.7.- Niveles de riesgo para la salud por exposición al criseno.
- 6.13.8.- Modelo de caja de la frecuencia de Micronúcleos en los diferentes sitios de estudio.
- 6.13.9.- Modelo de caja para el índice de división celular en los diferentes sitios de estudio.
- 6.13.10.- Modelo de caja para la frecuencia del Índice Mitótico en los diferentes sitios
- 6.13.11.- Modelo de caja para la frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas por Célula.
- 6.13.12.- Modelo de caja para la frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas por Cromosoma.
- 6.13.13.- Modelo de caja para el Índice de Replicación de los diferentes sitios.
- 6.13.14.- Daño genotóxico al ADN en la población de estudio, aplicando el ensayo Cometa.
- 6.13.15.- Modelo de caja para la longitud de la cola del cometa.
- 6.13.16.- Modelo de caja para la relación cola/cabeza del cometa.
- 6.13.17.- Cromatograma del standard de referencia con los 16 HPA's (A) y Cromatograma con el blanco de reactivos (Hexano- Diclorometano (1:1))
- 6.13.18.- Ejemplo de muestra de los 16 HPA's analizados en fase particulada utilizando filtros Cuarzo.
- 6.13.19.- Ejemplo de muestra de los 16 HPA's analizados en fase gaseosa utilizando filtros PUFF.

## **TABLAS**

- 1.- Factor de Equivalencia Tóxica de los HPA's .
- 4.7.- Condiciones meteorológicas de cada sitio por días de monitoreo
- 5.1.1. Parque vehicular del municipio de Comalcalco
- 5.1.2. Parque vehicular del municipio de Paraíso
- 5.1.3. Parque vehicular del municipio de Reforma, Chiapas
- 5.1.4. Parque vehicular del municipio de Balancan.
- 5.1.5. Parque vehicular del municipio del Centro.
- 6.1.1.- Comparación de algunas variables antropométricas entre sujetos expuestos y no expuestos a diferentes HPA's .
- 6.2.- Características antropométricas, clínicas y antecedentes familiares.
- 6.3.- Uso de Plaguicidas e Insecticidas entre niños expuestos y no expuestos a HPA's.
- 6.3.A.- Número de muestras de HPA's por sitio de muestreo y condiciones de operación Del Equipo durante el monitoreo.
- 6.4.- Periodo de datos Meteorológicos.
- 6.5.- Temperatura promedio en el período de monitoreo.
- 6.6.- Distribución de las concentraciones totales del HPA's ( $\text{ng m}^{-3}$ ) entre los Componentes gaseosos y particulado de dos regiones (población expuesta y Población no expuesta) en el estado de Tabasco con diferente actividad.
- 6.7.- Concentraciones de algunos de los HPA's encontrados en las dos regiones estudiadas, con y sin actividad petrolera.

- 6.8.- Concentraciones típicas de HPA's en diferentes fuentes.
- 6.9.- Relaciones diagnósticas para las fuentes de combustión y petróleo/combustibles.
- 6.10.- Comparación de la Concentración entre Hidrocarburos con predominio en fase Gas y fase partícula ( $\text{ng m}^{-3}$ ).
- 6.11.- Concentración de HPA's en cada sitio de estudio.
- 6.12.- Límites de HPA's en el aire ambiente de varios países.
- 6.13.- Valores potenciales de Riesgo de los HPA's por inhalación.
- 6.14.- Comparación de las concentraciones de HPA's en la Atmósfera de varios países.
- 6.15.- Evaluación de los Biomarcadores en población infantil.
- 6.16.- Porcentaje de viabilidad celular en las muestras de sangre periférica de niños que habitan los diferentes sitios de estudio.
- 6.17.- Rango de valores de micronúcleos reportados en la literatura mundial en niños. (Neri, et al. 2005).
- 6.18.- Valores obtenidos en la batería de biomarcadores aplicados a la población infantil en cada sitio de estudio.
- 6.19.- Comparación de los biomarcadores entre los grupos de población infantil expuesta y no expuesta.
- 6.20.- Comparación de los biomarcadores (Medianas) con respecto a la variable: tipo de combustible para cocinar.
- 6.21.- Relación significativa entre los factores de confusión y los biomarcadores.
- 6.22.- Modelo múltiple asociado a los Biomarcadores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Humberto Bravo Alvarez, Jefe de la Sección de Contaminación Ambiental, del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por estar siempre presente en mi formación profesional durante la mitad de mi vida.

A la Dra. Patricia Ostrosky Wegman, Jefe del laboratorio de Genómica, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por mostrarme de manera enérgica el camino hacia el conocimiento perdurable, aplicable a muchas cosas de mi vida académica.

A los miembros del Comité del Jurado: Dra. Patricia Ramos Morales, Dra. Teresa Imelda Fortoul Vander Goes, Dr. Rodolfo Sosa Echeverría, Dr. Emilio Rojas del Castillo y Dra. Regina Dorinda Montero Montoya, por las aportaciones y recomendaciones tan valiosas para el enriquecimiento del trabajo final.

A la Q.F.B. Montserrat Sordo Cedeño, Técnica Académica del Laboratorio de Genómica, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por la asesoría técnica en el manejo de métodos de ensayo citogenéticos como los biomarcadores de daño temprano. Por sus acertados consejos en la revisión de la Tesis, que fueron de gran utilidad.

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo, Jefe del Laboratorio de Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por la valiosa asesoría técnica en el montaje de la Técnica de Ensayo Cometa en el Lab. De Ecotoxicología de la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT. Por ser un excelente guía en el desarrollo de la tesis.

Al M.I. Omar Amador Muñoz, Técnico académico del Lab. De Mutagénesis Ambiental, del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por la asesoría técnica en los métodos de análisis de cromatografía de gases y acertados consejos.

Al Dr. Rodolfo Sosa Echeverría, investigador asociado y al Técnico académico Biol Pablo Sánchez Alvarez de la Sección de Contaminación Ambiental, del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por la asesoría técnica en los métodos de monitoreo de hidrocarburos en el aire, por mostrarme siempre el lado alegre de las cosas en los momentos difíciles. Y contagiarme de su entusiasmo para lograr lo imposible, gracias por su amistad.

## DEDICATORIA

*Señor, gracias por ser mi guía, apoyo y fortaleza para conducirme en el camino para poder llegar al final.*

*A mis queridos padres por darme tanto amor y felicidad, impulsando siempre la realización de mis proyectos y metas, dedico este esfuerzo.*

*A Betinho porque juntos siempre haremos un excelente equipo; su amor, paciencia y guía, fueron la fuerza propulsora para no flaquear a pesar de todo y llegar hasta el fin.*

*A mi razón de ser; Ale, Andy y Betito, por comprender y saber esperar hasta la conclusión. Este logro es para ustedes, para que sigan el ejemplo y el camino para alcanzar el mayor de los éxitos en su vida profesional.*

*A Carlitos, Marilú, Manolo, Abi, Beto y Lety; a mis adorables sobrinos: Paola, Manolo, Andrés, Gabi, Lupita, Arturo, César y Fanny. Fredy eres grande, no sé que hubiera hecho sin tu apoyo a distancia, nunca lo olvidaré gracias. A Lupita y Gabriel. Porque cada uno contribuyó con entusiasmo y cariño. Sus consejos en los momentos difíciles me ayudaron a seguir adelante.*

*A mi querido suegrito, gracias por la motivación e impulso constante, que al igual que formó a unos brillantes hijos profesionales y triunfadores, ahora desea lo mismo para mí.*

*A Marilú, Paty, Chela, Adriana, Araceli, Josefina, Rosita, Sonia y Liliana; gracias por brindarme su amistad, por estar conmigo en las buenas y en las malas.*

*En memoria de mis queridas e inolvidables amigas, donde quiera que se encuentren estoy segura que me están echando porras: Nagive, Oli y Lilian.....*

## **R E S U M E N**

---

El estado de Tabasco depende económicamente de la extracción del petróleo. Sin embargo, esta actividad afecta al ambiente y a las comunidades que lo habitan. Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's), son contaminantes producto de la extracción del petróleo y pueden estar presentes en suelo, agua y sedimentos, debido a su volatilidad pueden llegar a los seres vivos y causar daño genotóxico. El objetivo principal del presente trabajo fue cuantificar los niveles de HPA's en la atmósfera de varios sitios y analizar su relación con la inducción de daño al ADN en habitantes de la región. Se aplicó una batería de biomarcadores de daño temprano: el Ensayo de Electroforèsis Unicelular (Ensayo Cometa), Cinética de Proliferación Celular (CPC) y frecuencia de Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica organizados en seis grupos de niños entre 6 y 15 años de edad. Las muestras de HPA's fueron analizadas por el método de EPA TO-13-A. Los resultados indicaron la presencia de la mayoría de los 16 HPA's considerados por EPA-US, como prioritarios por ser agentes carcinogénicos.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de concentración de los hidrocarburos en fase gaseosa y particulada, los valores más altos de HPA's se registraron en la fase gaseosa y las máximas concentraciones de HPA's se registraron en los sitios de estudio expuestos a actividad petrolera. Todos los grupos infantiles en zonas con alta actividad petrolera presentaron niveles de daño genotóxico de moderado a alto para el caso del ensayo cometa (Longitud de cola: 14.21 a 42.14  $\mu\text{m}$  y relación cola/cabeza: 0.97-2.83  $\mu\text{m}$ ) comparados con los valores promedio del grupo control (LC= 12.25 y C/C= 0.63  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Tanto el Índice Mitótico como el Índice Replicativo presentaron valores dentro del rango de normalidad de acuerdo a la literatura. Las frecuencias de ICH y Micronúcleos mostraron valores ligeramente altos en los sitios con actividad petrolera. La población de estudio que presentó un mayor daño al ADN, se registró en el sitio de intensa actividad petrolera Nuevo Torno Largo. Los datos obtenidos indican que la presencia de HPA's en la atmósfera representan un riesgo para la salud de las poblaciones crónicamente expuestas a hidrocarburos volátiles generados por las instalaciones petroleras.

**Palabras clave:** genotoxicidad, hidrocarburos Policíclicos aromáticos, ensayo cometa, electroforesis unicelular, micronúcleos, cinética de proliferación celular, HPA's.

## ***1.- INTRODUCCION***

---

Las actividades petroleras que se llevan a cabo en el Estado de Tabasco, involucran acciones de grandes dimensiones que pueden llegar a afectar drásticamente el ambiente. La explotación de hidrocarburos en el sureste del Golfo de México ha jugado un papel muy importante en la economía y el proceso de desarrollo del país. Actualmente, los Estados de Campeche, Tabasco, Norte de Chiapas y Sur de Veracruz, representan el 85 % de la producción nacional de petróleo, generando  $2.7 \times 10^6$  barriles por día y 1 800 millones de pies cúbicos de gas, lo que ha generado una problemática para el ambiente y la salud pública, producto de la intensa actividad de extracción y separación de crudo, así como en el procesamiento de gas. (Díaz-González *et al.*, 1995; Guzmán, 1988).

Sin embargo esta industria que participa en el desarrollo económico de la región y del país, contribuye también al deterioro ambiental. Diversos estudios han mostrado que cantidades importantes de residuos y subproductos del petróleo se han vertido en los ecosistemas afectando su biodiversidad (Botello *et al.*, 1996; Gold-Bouchot., *et al.*, 1997, Noreña-Barroso *et al.*, 1999) y presentando riesgo para la salud humana (Farmer *et al.*, 2003; Platt *et al.*, 2008).

Durante los años sesentas y setentas, la economía Tabasqueña experimentaba un proceso de industrialización petrolera acelerada, que se ve reflejada en la construcción de plantas criogénicas, centros procesadores de gas y petroquímica básica, torres de perforación, baterías procesadoras de gas, gaseoductos, oleoductos; la rápida expansión de las actividades petroleras, ha ido acompañada de la planeación necesaria, para minimizar el impacto al ambiente por la generación de contaminantes que desde entonces son vertidos al agua, aire y suelo, mostrando un paisaje de demarcación ambiental y por consiguiente poniendo en peligro la supervivencia del ecosistema y en consecuencia la salud de los habitantes de las inmediaciones de las zonas petroleras del Estado de Tabasco. (Beltrán. 1988 y Gómez, 2007).

En el estado de Tabasco, las evaluaciones del impacto por las actividades de extracción de petróleo se han realizado desde hace 20 años. Los compuestos orgánicos volátiles han recibido especial atención; en particular, los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's) ya que son agentes potencialmente carcinogénicos (Tuntawiroon *et al.*, 2007). Actúan tanto de manera

individual como a través de mezclas. (Perera, 1996; Kalantzi, *et al*, 2004). Los efectos de estas emisiones al ambiente, son generalmente inespecíficos y se pueden asociar a múltiples causas, (Ruan, *et al*, 2007; Motelay, 2003).

Se han reportado concentraciones importantes de HPA's en el suelo, sedimentos y el agua de la región, (Climent y Torres, 2007), pero, no hay registros de la presencia de estos compuestos asociados a partículas en la atmósfera. Como tampoco se dispone de información sobre el impacto de estos compuestos en la salud humana.

Es importante mencionar que además de las fuentes de emisión de hidrocarburos de origen petrogénico en Tabasco, existen otras fuentes de HPA's la emisión a la atmósfera de *humo de leña*, sobre todo en época de secas, se acostumbra aplicar la práctica ancestral de *Roza-Tumba-Quema* de pastizales, con el objeto de preparar la tierra para cultivo. La utilización de leña es muy importante en países en vías de desarrollo. Datos de la OMS 1995, indican que 1 280 millones de personas la emplean de manera cotidiana, lo que explica su trascendencia en términos de salud pública, por su disponibilidad, bajo precio y su proporción mayor como fuente de energía; la leña es el combustible más importante después del petróleo, carbón y gas. (Yunker *et al*, 2002; Lewtas, 2007; Jeffrey *et al*, 2006).

La mayoría de las comunidades rurales de Tabasco, acostumbran cocinar con leña y generalmente no cuentan con sistemas de ventilación eficientes, ocasionando que la población se encuentre en contacto cotidiano con los hidrocarburos policíclicos aromáticos, como los benzopirenos, lo que pueda desencadenar algún problema de tipo respiratorio, mutagénesis y/ò cáncer.

En México en 1990 uno de cada tres mexicanos utilizaban leña para cocinar, el 91 % de los habitantes en el área rural y 11% en zonas urbanas. Concentrándose el 35.36% en Tabasco. De acuerdo a los reportes de la Secretaría de Salud en el año 2000, la población que utiliza leña o carbón en el Estado de Tabasco fue de 669 015 habitantes en 128 182 viviendas. (DGSA, 2002). Esta situación se considera un problema de salud pública con repercusiones en la población menor de cinco años y en mujeres en edad reproductiva.

Otra fuente no menos importantes de exposición a HPA's, en las cuales la población infantil se encuentra expuesta indirectamente, es el inhalar productos de *la combustión del tabaco*.

Cuando el niño vive en un ambiente de fumadores; la contaminación de HPA's, generada en intramuros es un factor de riesgo para el niño que puede desencadenar algún tipo de cáncer de pulmón.; ya que cuando se quema el tabaco, se produce una compleja mezcla de gases, vapores y material particulado, (Hoffmann, *et al.*, 2005; IARC, 2004; Husgafvel-Pursiainen, 2004; Vives, *et al.* 2001).

En un estudio epidemiológico en población de fumadores pasivos en hogares de china, se analizaron las causas que desencadenaban los casos de cáncer de pulmón y se llegó a la conclusión que los HPA's al llegar al organismo son activados por intermediarios genotóxicos, oxidándose por varios caminos, originando metabolitos que forman aductos en el ADN. (Qing Lan, *et al* 2004). Se han llegado a identificar más de 4 500 compuestos, de los cuales al menos 50 tienen un efecto carcinogénico comprobado (Awata , *et al*, 1998; Gouveia y Fletcher , 2000).

En México, el tabaquismo es un problema de salud pública prioritario que involucra una amplia variedad de consecuencias adversas para la sociedad, constituye el principal factor de riesgo en niños con padres fumadores asociados a la presencia de marcadores ambientales tales como metabolitos como la cotinina. Se ha demostrado según estudios desarrollados por el Instituto Nacional de Salud Pública, que los niños de menor edad son más susceptibles a la exposición ambiental por el humo del tabaco, desencadenando predisposición a infecciones agudas y crónicas respiratorias. (Lazcano-Ponce, *et al* 2007).

De acuerdo al Plan Nacional de Salud 2001-2006, la encuesta realizada por la Secretaría de Salud a nivel Nacional, en el sureste mexicano las edades donde se encontró el mayor número de fumadores pasivos oscilaban entre los 12 y 17 años. (DGSA, 2002; Ramírez, *et al* 2006).

Los derivados del petróleo constituyen una mezcla compleja de sustancias químicas genotóxicas, como el benzo (a)pireno así como los extractos que contienen carbón orgánico asociado a partículas que pueden causar alteraciones en diferentes modelos biológicos (Lee *et al.*, 1998; Hininger, *et al*, 2004., Celik' y Akba, 2005; Lándi, *et al* 1999; Alves, *et al* 2000; Moteley, *et al* 2003; Bloemen, *et al* 2004).

Existen numerosos métodos para seguir las rutas de exposición de los humanos a diversos agentes genotóxicos, por ejemplo es posible determinar la presencia y cantidad de las sustancias o sus metabolitos a través de los fluidos biológicos, o por alteraciones genéticas, que resultan de la

reacción entre el organismo expuesto y la sustancia química. Se utilizan los *Marcadores Biológicos*, para conocer el daño genotóxico en un organismo de manera temprana, por medio de metodologías basadas en alteraciones ultraestructurales a nivel celular, para identificar los cambios moleculares o celulares en los sistemas biológicos producidos por la exposición a xenobióticos, como lo son los ensayos Cometa, Micronúcleos ó Intercambio de Cromátidas Hermanas, entre otros.

Estas pruebas son indicadores sensibles de daño y han sido utilizados ampliamente en investigaciones sobre los efectos de exposición de individuos a sustancias genotóxicas. (Gonsebatt *et al.*, 1995; Shugart, 2000; Celik' y Akba, 2005).

La mayoría de los agentes que tienen actividad genotóxica como los HPA's y sus metabolitos, poseen la capacidad de inducir daño al ADN, detectable en diferentes sistemas de ensayo, tanto *in vivo* como *in vitro*, que describen entre otros, los efectos clastogénicos y aneugénicos, inducción de daño oxidativo, rompimientos y transformación celular del ADN, originados por estos compuestos (Kyrtopoulos, 2006).

La importancia y trascendencia científica del monitoreo biológico como instrumento temprano de evaluación de exposición ambiental a compuestos químicos como HPA's, ha llevado a múltiples países a incluir, en el nivel normativo y legal, al monitoreo biológico temprano como una valiosa herramienta para la prevención de daño en la salud de las poblaciones y para distinguir a los individuos expuestos de los no expuestos, discriminar entre los expuestos a los más susceptibles, así como evaluar los efectos a bajas dosis de mezclas complejas de sustancias tóxicas, a partir de la medición de las concentraciones de los productos químicos o de sus metabolitos en muestras de diferentes tejidos como son en sangre y orina de las poblaciones.

Por ejemplo, para medir el daño genético en células germinales y somáticas, aberraciones cromosómicas, mutaciones, formación de aductos en el ADN entre otros, se utilizan compuestos como el benzo (a) pyreno y sus metabolitos; por ser un biomarcador muy sensible, es utilizado como control positivo ya que sirve como indicador de referencia para predecir genotoxicidad/carcinogenicidad; al aplicar biomarcadores de daño temprano como: los ensayos de intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, cometa, etc. (Perera, 2008., Platt *et al.*, 2008., Lewtas, 2007), DeMarini *et al*, 1996; Plerola, *et al* 2003; Lewtas, 2007).

El presente estudio constituye uno de los primeros estudios realizados en el estado de Tabasco, enfocados a evaluar los niveles de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en la atmósfera, relacionados con los efectos citogenéticos en poblaciones infantiles expuestas a diferentes procesos pirogénicos y petrogénicos, mediante el uso de biomarcadores de efecto de daño temprano, como son los ensayos de Micronúcleos, Intercambio de Cromátidas Hermanas y Cometa.

## ***2.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA***

---

Se ha generado interés por identificar los posibles factores etiológicos que pudieran explicar la incidencia y prevalencia de cáncer en el Estado de Tabasco. En los últimos años se ha presentado un incremento en la prevalencia de cáncer en diferentes municipios del estado. Dado que la etiología del cáncer es multifactorial, pueden existir factores genéticos en la población, que interactúan con factores dietéticos, hábitos, infecciosos y de manera importante con los ambientales.

Es difícil establecer una relación directa de causa-efecto entre los contaminantes atmosféricos de tipo químico, con la alta incidencia de casos de cáncer. Es en relación a estos contaminantes, que se enfoca la presente investigación; para determinar si el daño en la salud humana observado, pudiera estar asociado con la exposición atmosférica a sustancias químicas que tienen actividad genotóxica y que específicamente los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's), pudieran ejercer algún impacto sobre la salud de las poblaciones infantiles en riesgo, al estar en contacto con estos compuestos tóxicos y desencadenar la patología prevaleciente en la Región.

El presente estudio plantea la determinación de los niveles de distribución de los HPA's en el aire, en relación a diferentes fuentes de emisión. Cortés Peñalosa y colaboradores en 1994, sugieren la posible relación de la contaminación por hidrocarburos con la incidencia y prevalencia de ciertas enfermedades neoplásicas en algunas Regiones del estado de Tabasco. Estos autores revisaron los casos de Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) infantil, reportada en el estado, durante el período 1985-1991, encontrando un incremento en la incidencia en los municipios de la Región de la Chontalpa (Norte y Costa del Estado; donde se encuentra la mayor actividad de hidrocarburos) y menores incidencias en la Región de los Ríos (Sur-Este). La Secretaría de Salud reportó en 1994 a la LAL, como la tercera causa de mortalidad infantil en el estado. El INEGI en 2001, presenta como la segunda causa de defunción a nivel Nacional a los tumores malignos, de los cuales el 13.2% se registraron en el estado de Tabasco. Y como octava causa de defunción las malformaciones congénitas, deformaciones y

anomalías cromosómicas en un 2.1% a nivel Nacional y en un 3% en el estado. (INEGI, 2001).

En algunas Regiones del Estado de Tabasco, se llevan a cabo actividades de transporte de petróleo crudo e hidrocarburos, así como de mantenimiento de las instalaciones petroleras, cuya fuente potencial de exposición son principalmente los HPA's, los cuales son producto de las actividades de: desazolve de registros de drenajes industriales, limpieza de fondajes de tanques de almacenamiento, llenado y vaciado de recipientes de residuos peligrosos, mantenimiento y limpieza de separadores de aceites, manipulación de lodos residuales en operaciones de muestreo, cambios de filtros y mallas en sistemas de separación, operaciones de control en fugas y derrames, lavado de tanques de almacenamiento, etc.

La presente investigación constituye uno de los primeros estudios enfocados en evaluar los niveles de HPA's en la atmósfera del Estado de Tabasco, asociados con el riesgo en la salud de las poblaciones expuestas, que habitan en las inmediaciones de las instalaciones petroleras.

## **2.1 .- OBJETIVOS**

### **2..1.1 GENERAL**

- Evaluar el impacto de mezclas atmosféricas que contienen hidrocarburos policíclicos aromáticos en linfocitos de sangre periférica de poblaciones infantiles de varias regiones del Estado de Tabasco.

### **2.2.2 ESPECÍFICOS**

- Establecer mediante un instrumento epidemiológico, las características personales y los estilos de vida de la población infantil expuesta en el estudio.

- Evaluar el daño genotóxico y citotóxico en linfocitos de sangre periférica de poblaciones infantiles expuestas y no expuestas (controles) a HPA's, utilizando una batería de biomarcadores de exposición de daño temprano: frecuencia de Micronúcleos (MN), Cinética de Proliferación Celular e Intercambios de Cromátidas Hermanas (CPC) y el Ensayo Cometa (Técnica de electroforesis unicelular en microgel).

- Determinar los niveles de HPA's en la atmósfera de diferentes sitios del Estado de Tabasco, utilizando la técnica TO-13 de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y relacionarlos con parámetros meteorológicos de cada sitio de monitoreo.

- Valorar las relaciones entre los Biomarcadores de Genotoxicidad con los datos de Hidrocarburos y estilos de vida de las personas en estudio.

## 2.2 .- HIPÓTESIS

Diversas actividades realizadas en el Estado de Tabasco, generan y vierten al ambiente, cantidades no determinadas de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos, producto de la combustión incompleta de materia orgánica, ya sea de combustible fósil o por la vegetación. Estos compuestos son químicamente inertes e hidrofóbicos, sin embargo, bajo una activación metabólica en células de mamíferos a diol-epóxidos (alquilación y estrés oxidativo), pueden unirse covalentemente a macromoléculas celulares (ADN), causando error en la replicación y mutaciones que desencadenan alteraciones en las células que pueden generar procesos carcinogénicos.

Aunque no se cuenta con estudios suficientes para determinar la exposición de la población infantil a HPA's en el Estado de Tabasco, se ha sugerido recientemente la posible relación de causalidad con la incidencia de algunas enfermedades neoplásicas. En base a lo anterior, resulta posible que las comunidades del estudio de las zonas de influencia, se encuentren expuestas crónicamente a hidrocarburos de naturaleza genotóxica y citotóxica, lo cual pueda generar alteraciones celulares demostrables por medio de biomarcadores de daño temprano a nivel de ADN.

La capacidad de los hidrocarburos de producir daño citotóxico y genotóxico en las células, permite predecir que la constante exposición a estas sustancias tóxicas a través del ambiente, disminuye la capacidad de proliferación de los linfocitos *in vitro*, además de incrementar la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) y de Células Binucleadas (CBN) con Micronúcleos (MN) y la fragmentación y rompimiento de las cadenas de ADN en los núcleos de las células de los niños que habitan cerca de instalaciones que generan hidrocarburos a la atmósfera como resultado de procesos de combustión.

## **2.3 .- METAS**

Las metas que se plantearon en el estudio se describen a continuación:

- Elaborar y aplicar un instrumento epidemiológico a 75 personas habitantes de varias regiones del Estado de Tabasco para establecer información mínima sobre sus estilos de vida.
- Elaborar y aplicar un programa de muestreo del aire en 5 puntos del Estado de Tabasco para generar datos sobre los Hidrocarburos presentes en la atmósfera de cada una de estas regiones.
- Elaborar y Aplicar un programa de toma de muestras sanguíneas a 75 personas habitantes del Estado de Tabasco, con el objeto de realizar pruebas de Genotoxicidad.
- Aplicar una batería de 4 Biomarcadores de cito-genotoxicidad (Micronúcleos, Cinética de Proliferación Celular, Intercambio de Cromátides Hermanas y ensayo cometa ) en muestras de sangre de 75 personas.

### **3 .- ANTECEDENTES**

---

Algunos estudios coinciden en que existe una asociación entre la exposición a contaminantes del aire y el incremento en la formación de aductos en el ADN. Los experimentos *in vivo/ in vitro* han evidenciado la genotoxicidad producto de sustancias químicas del aire como precursoras de daño oxidativo en el ADN. (Vineis y Husgafvel, 2005).

En Silasia, Polonia se analizó la exposición genotóxica a mezclas complejas como los HPA's y metales en poblaciones infantiles. Para tal fin se evaluó el daño citogenético en 74 niños en edades entre 5 y 14 años, que vivían en dos ciudades muy contaminadas, midieron plomo en sangre y 1- hydroxipireno en orina y relacionaron estos valores con la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) y Micronúcleos (MN); presentando valores promedio de MN de 4.44 en 1000 células binucleadas y un rango promedio de ICH entre 6.24 y 10.06, los autores concluyen que la influencia de agentes ambientales en la inducción de daño citogenético en linfocitos humanos, puede originarse por exposición intra y extramuros (Miel, *et al.*, 2006).

La investigación realizada por Bocskay y colaboradores (2005), muestra que cuando una madre se expone a hidrocarburos Policíclicos aromáticos provenientes del aire, los recién nacidos presentan cambios a nivel cromosómico e incrementan el riesgo de contraer cáncer como la Leucemia; los autores identificaron los cambios cromosómicos que ocurrían en el cordón umbilical de 60 recién nacidos afroamericanos y dominicanos que nacieron en el Hospital de salud ambiental "Columbia Center de New York". Los resultados sugieren que la exposición de una madre a HPA's puede transmitir los cambios citogenéticos a los recién nacidos y ocasionar riesgo de contraer cáncer en el infante.

Neri y colaboradores (2005), establecen una relación causa- efecto en niños con algún tipo de enfermedad neoplásica; realizan una revisión sobre los factores ambientales que pueden incidir en el desarrollo de cáncer en niños y comprueban que existe una relación entre la presencia de algún agente causal durante las etapas de crecimiento del niño asociado con la

exposición de agentes genotóxicos, lo que incrementa el riesgo de contraer cáncer (Wild *et al*, 2003; Steliarova, 2004).

Ruchirawat y colaboradores (2005), estudiaron una población de niños de Bangkok, Tailandia en edad escolar en ciudades con carga vehicular elevada con riesgo potencial de exposición a partículas asociadas a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's) y utilizaron algunos biomarcadores de daño temprano como el Ensayo Cometa. Los resultados muestran, que los niños de zonas urbanas, son más vulnerables a impactos en la salud asociados por exposición a contaminantes genotóxicos que los niños que viven en zonas rurales y que pueden desarrollar ciertos tipos de Cáncer. El estudio presenta los valores encontrados para ensayo cometa entre otros biomarcadores, en los parámetros de; longitud de cola =  $1.93 \pm 0.09$   $\mu\text{m}$  y momento de cola =  $0.23 \pm 0.01$   $\mu\text{m}$ .

Se ha observado en general, de acuerdo con Hoffmann y colaboradores (2005), que por cada nanogramo por metro cúbico de hidrocarburos policíclicos aromáticos, especialmente el B(a)P, se puede presentar un incremento del 5% en las tasas de mortalidad por cáncer pulmonar en personas no fumadoras del sexo masculino. Por lo que se considera a los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) y a sus derivados (nitro, hidroxilo y alquilo) importantes contribuidores a la mutagenicidad y carcinogenicidad en los organismos. (Amador, 2003; Kalantzi *et al*, 2004).

Perera (2008), analiza los factores capaces de desencadenar cáncer infantil por exposición a Hidrocarburos y concluye que los niños desde antes de nacer y durante los primeros años de vida, son más susceptibles a cualquier variedad de combustibles fósiles como los HPA's, junto con los estilos de vida, hábitos alimenticios, malnutrición; lo que les ocasionará un daño genético irreversible como son los aductos en el ADN. Además de que los efectos por la exposición temprana a dichos contaminantes se podrán manifestar años más tarde.

En México existen pocos estudios enfocados al efecto en la salud humana relacionados con la composición orgánica de compuestos volátiles de la atmósfera como los HPA's; Amador (2003), relaciona las partículas inhalables (< 10 micras) con hidrocarburos y

determina la materia orgánica extraída en estas partículas, encontrando una amplia relación con la intensa combustión de diesel y gasolina emitida por fuentes vehiculares.

En el estado de Tabasco, no existen estudios disponibles desde el punto de vista de la salud pública que se dirijan a establecer el grado de exposición de la población a hidrocarburos (HPA's) y al impacto que estos compuestos puedan tener sobre la salud de los habitantes cercanos a algún proceso de combustión incompleta. (Gunnar, 2003).

Una revisión realizada sobre los casos de Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) infantil, reportada en el Estado, durante el período 1985-1991, realizada por Cortés y colaboradores (1994), sugieren una posible relación causa-efecto de la contaminación por hidrocarburos con la incidencia y prevalencia de ciertas enfermedades neoplásicas en algunas regiones del Estado, como en los municipios de la Región de la Chontalpa (Norte y Costa del Estado; donde se encuentra la mayor actividad de hidrocarburos), mientras que las menores incidencias pertenecían a la Región de los Ríos (Sur- Este).

Por otro lado, la Secretaría de Salud reportó en 1994 la LAL como la tercera causa de mortalidad infantil en el Estado. INEGI en 2001, presenta como la segunda causa de defunción a Nivel Nacional a los Tumores malignos con 12.7% y 13.2% en el Estado. Como octava causa de defunción se encuentran las malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas con un 2.1% a nivel Nacional y 3% a nivel Regional. (INEGI, 2001).

Aunque se han realizado diferentes estudios que evalúan el impacto de las actividades petroleras en el Estado de Tabasco por Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en suelo, aire, sedimentos y agua, principalmente se han enfocado a la determinación de los niveles de HPA's en organismos acuáticos, en donde las concentraciones máximas de hidrocarburos, se encontraron en zonas cercanas a algún proceso proveniente de la transformación del petróleo (Díaz-González, *et al*, 1995; Botello, *et al*, 1996; Gold -Bouchot, 1997).

En la literatura revisada sobre los trabajos realizados en el estado de Tabasco, por el impacto de los HPA's en los ecosistemas, destacan los desarrollados por Vázquez- Botello y colaboradores, quienes en la década de los ochentas y principios de los noventa, dedicaron

especial atención, a los efectos de los hidrocarburos, producto de la intensa actividad petrolera y de los accidentes ocurridos en esa época, en las zonas costeras del Golfo de México.

Botello y colaboradores en 1996, realizaron estudios en sedimentos para evaluar la presencia de HPA's en la plataforma continental de Tabasco, demostrando la presencia de altos niveles de HPA's en las lagunas costeras de Mecoaacán en Tabasco. Encontraron principalmente HPA's conformados por 3 y 4 anillos bencénicos como Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)Antraceno y Criseno. Los cuales se originaron a través de procesos de altas temperaturas o pirólisis principalmente por quema de combustibles fósiles.

Asimismo, el Fenantreno es uno de los compuestos más característicos y abundantes en áreas donde existe la presencia de petróleo, cuyo origen son los productos de desecho de la industria petrolera. En otro estudio, los autores también evalúan los hidrocarburos policíclicos aromáticos en suelos hidromórficos de la reserva de la biósfera en los pantanos de Centla, Tabasco, reportando valores muy elevados para los compuestos de pyreno, criseno y benzo(a) pyreno, haciendo mención especial sobre la contribución de la industria petrolera y sus derivados en toda la Región del Sureste de México (Veracruz, Tabasco y Campeche).

En el caso del impacto de los hidrocarburos en suelos de Tabasco, se pueden mencionar los estudios de Zavala y colaboradores (1996). En donde se destaca la importancia en el destino de los hidrocarburos del petróleo en el suelo que es afectado por su distribución, volatilización y potencial de lixiviación. Realiza un diagnóstico sobre los Hidrocarburos en el campo petrolero de Samaria, concluyendo que las tierras con baja contaminación, presentan niveles de HPA's por encima de las concentraciones típicas registradas para suelos con respecto a otras áreas de México. Las tierras más contaminadas se relacionan con la zona de mayor concentración de instalaciones de explotación, almacenamiento y conducción de hidrocarburos y exposición a derrames de petróleo.

De la Cruz, (1997) evaluó de los niveles de hidrocarburos en agua y sedimentos de la Laguna el Limón en Macuspana, Tabasco, México y concluyó que la presencia de hidrocarburos en agua y sedimentos se debe principalmente a los aportes de las descargas en el pasado, del Complejo Petroquímico de Ciudad Pemex. Las concentraciones de HPA's en

sedimentos representan un riesgo potencial de toxicidad crónica, principalmente para los organismos acuáticos con hábitos bentónicos.

A finales de los años noventa, Gold-Bouchot y colaboradores, también establecen una relación entre los niveles de HPA's presentes en algunos crustáceos y peces de las zonas costeras y de cuerpos lagunares, aledaños a algún proceso petrolero. Los autores evalúan el impacto de los hidrocarburos sobre la especie *Crassostrea virginica*, de importancia económica para el estado de Tabasco, en las lagunas costeras del Carmen, en Mecoaacán, en donde se encontraron niveles altos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en los sedimentos de la laguna, debido al importante aporte de HPA's, producto de los derrames de Petróleo. Posteriormente en 1999, analizan los residuos de petróleo acumulados durante 2 años en los sedimentos de las lagunas costeras del Golfo de México, registrando altos niveles de HPA's. (Gold- Bouchot, *et al* 1999).

Valencia (2001), determinó la existencia de condiciones de riesgo en la salud humana por la presencia de una presa de terracería que contenía residuos de actividades de explotación y producción de hidrocarburos en la zona, identificó las posibles vías y rutas de exposición de sustancias tóxicas y caracterizó cuantitativamente el riesgo en el sitio por sustancias precursoras de cáncer. Concluyendo que la concentración de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's) y del Benceno en productos del petróleo varían dependiendo del tipo de aceite crudo y de los procesos de fraccionamiento usados para obtener los productos del petróleo; el Benzo(a)Pireno, Benzo(b)Fluoranteno, Criseno, Dibenzo(a)antraceno, Fluoranteno e Indeno (1,2,3,c-d)Pireno, que con frecuencia están presentes en pequeñas cantidades en el aceite crudo.

En otro estudio realizado en el 2003, por la comisión Interinstitucional del Medio Ambiente para el Desarrollo Social (CIMADES), se llevó a cabo una evaluación sobre la Calidad del Aire en el poblado Nuevo Torno Largo en el Municipio de Paraíso, Tabasco. En donde se analizan contaminantes del aire como las Partículas Suspendidas Totales, presentando valores que sobrepasaron la Norma NOM-024-SSA-1993 ( $325 \text{ mg/m}^3$ ), Dióxido de Azufre, Dióxido de Nitrógeno, Partículas  $\text{PM}_{10}$ , Acido Sulhídrico e Hidrocarburos Totales; los resultados muestran altas concentraciones en la población de Nuevo Torno Largo del Municipio de Paraíso, Tabasco. Es interesante mencionar que en el presente estudio, este sitio

fuè considerado como el de mayor impacto por hidrocarburos, por presentar las concentraciones de HPA's y los valores màs altos de genotoxicidad en el ensayo cometa, mostrando diferencias significativas con respecto a los otros sitios de estudio.

Ponce-Vélez en 2005, analiza la información generada desde hace 20 años, en relación a las concentraciones de hidrocarburos presentes en la columna de agua de ríos, lagunas, estuarios y áreas costeras de la región del Golfo de México; incluyendo la presencia de HPA's en sedimentos y organismos costeros, así como del posible impacto en los ecosistemas costeros de la región por el derrame petrolero del pozo Ixtoc-1 y presenta datos sobre los niveles de hidrocarburos dispersos en las aguas del Golfo de México durante 1980 a 1993; entre los cuales destacan algunas lagunas costeras de Tabasco, como el sistema Carmen-Machona y Mecoacán, en el que se registraron niveles altos de HPA's, entre 50-100  $\mu\text{g g}^{-1}$ , derivados de las actividades rutinarias de exploración, perforación y transporte de petróleo; destaca el caso de la laguna de Mecoacán està impactada por la cercanía a la terminal petrolera Dos Bocas, la cuál tiene una capacidad de almacenamiento de aproximadamente 6 millones de barriles de petróleo crudo. (Ponce Vélez G. y Botello A.V., 2005).

En relación al marco normativo en México, actualmente no se cuenta con una Norma Oficial Mexicana en relación a HPA's en el aire, sin embargo para evaluar el impacto de estos compuestos sobre suelos, por ejemplo el derivado por derrames de Hidrocarburos, el 20 de Agosto de 2002, el Diario Oficial de la Federación, emite la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, para establecer los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos.

## **4 .- MARCO TEORICO**

---

### **4.1 .- ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA's)**

Los HPA's son un grupo numeroso de compuestos orgánicos, con anillos aromáticos derivados del benceno que contienen carbono e hidrógeno exclusivamente. Son considerados como dos o más anillos de benceno fusionados entre sí con al menos dos carbonos en común, siempre formados por estructuras polinucleares de tipo aromático, lipofílicas, tendencia que se incrementa con el aumento de su masa molecular, son inestables fotoquímicamente ya que se degradan con la luz (Albers, 1995; Bôstrom, *et al*, 2002).

En general se caracterizan por tener baja hidrosolubilidad y de baja a moderada volatilidad y su vida media varía de 1 a 48 horas en el aire, de 1 semana a 2 meses en ambientes acuáticos, de 2 meses a 2 años en suelos y de 8 meses a 6 años en sedimentos. En la naturaleza son hidrofóbicos y tienden a absorberse rápidamente sobre material suspendido y al sedimentarse constituyen un reservorio en los sedimentos (Botello, 2005).

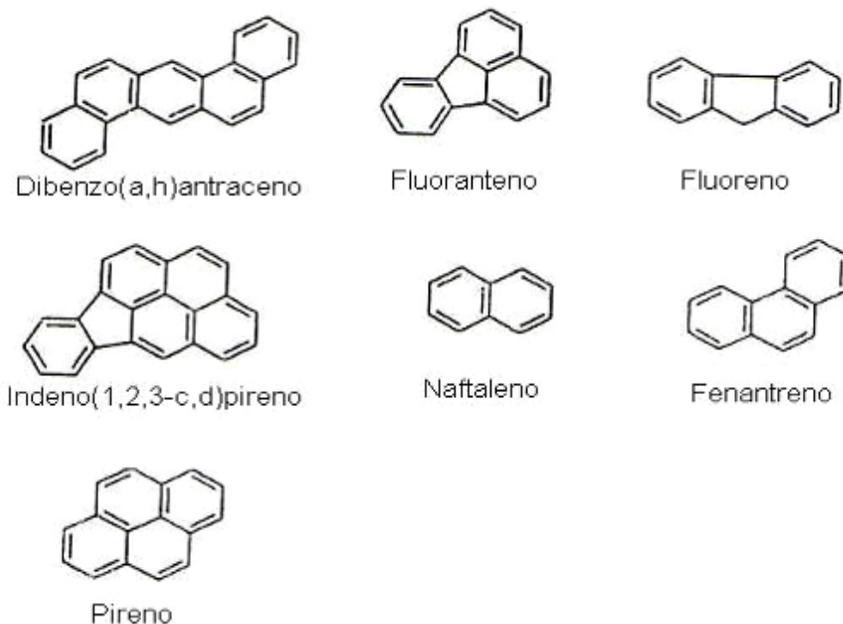
Son compuestos como el petróleo crudo, creosota, carbón y alquitrán que se encuentran en forma natural en el ambiente. Estos compuestos, que pueden ser alrededor de 100 (ATSDR, 1996), se originan durante una combustión incompleta de hidrocarburos como carbón, aceite, gas, tabaco, gasolina, diesel, madera, proceso de pavimentado de carreteras así como durante quemas forestales, agrícolas y de basura (Barale *et al.*, 1991).

En el ambiente, los HPA's se encuentran adsorbidos en la materia particulada y tienen dos mecanismos básicos de transformación: una oxidación inducida por ozono o mediante hidroxilación (Lee *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2007).

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA, 1999), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) han considerado a 16 HPA's prioritarios, debido a su actividad genotóxica, mutagénica o

carcinogénica (IARC, 1987; EPA, 1999; ATSDR, 1996). Esta clasificación tomó en cuenta el nivel de afectación a la salud y su potencial nivel cancerígeno y mutagénico.

Estos compuestos son naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno (1,2,3-c,d) pireno, benzo(g,h,i)perileno y dibenzo(a,h)antraceno (Barale *et al.*, 1991). La estructura molecular e los HPA's más importantes, se muestra a continuación:



**Figura 4.1.A Estructura común de los anillos de HPA's.**

La selección de estos compuestos se basa en varios factores como son: toxicidad, facilidad de obtener información acerca de ellos, exposición humana a estos compuestos a lo largo de la historia y su frecuente aparición en sitios contaminados. Y sus efectos sobre la salud humana dependen de la dosis, tipo y ruta de exposición así como de las características particulares del individuo expuesto.

Los HPA's de bajo peso molecular formados por 2 y 3 anillos aromáticos presentan una toxicidad aguda, mientras que algunos de los más pesados muestran potencial carcinogénico y mutagénico. (Botello A.V., 2005).

En el ambiente se encuentran en el aire, suelo y agua. Naturalmente se encuentran en el petróleo crudo, creosota, carbón y alquitrán. Se forman básicamente cuando la materia orgánica se somete a una temperatura alta durante cierto tiempo y a la capacidad de adsorción a las partículas atmosféricas, lo que les permite transportarse a grandes distancias y depositarse en lugares remotos de la fuente de emisión. Se originan durante la combustión incompleta de carbón, aceite, gas, tabaco, y durante quemas forestales. En la atmósfera, los HPA's son adsorbidos en la materia particulada, a través de dos mecanismos de reacción química y se transforman en agentes oxidantes inducidos por el ozono y por hidroxilación (Awata, 1998; Ramos, 2004).

Los HPA's pueden llegar a producir citotoxicidad, daño genético y clastogenicidad en células de mamíferos, por ejemplo el benzo(a)pireno, se hace más reactivo cuando se combina con luz ultravioleta y agentes alquilantes. La genotoxicidad de los HPA's depende en gran medida de su estructura asociados a las propiedades electrofílicas elevadas que permiten interaccionar con los enlaces covalentes (EHC, 1998; Hartwig *et al*, 2002; Seung, 2002).

Las poblaciones humanas expuestas a aire contaminado por HPA's, muestran un incremento en la formación de aductos en el ADN y se ha demostrado que las causas que contribuyen a la carcinogenicidad pueden ser la producción de especies reactivas del oxígeno, que pueden desencadenar un "stress oxidativo" y por consiguiente causar un daño oxidativo al ADN (Seoane, *et al*, 2000., Farmer, *et al*, 2003., Singh., *et al*. 2007).

En las últimas décadas se han realizado varios estudios relacionados con la acción biológica y destino de los HPA's. La exposición humana a estos compuestos se debe a la inhalación o ingestión (aunque también es posible su ingreso por vía cutánea).

Después de absorberse se distribuyen en diversos órganos y tejidos, su propiedad lipofílica le favorece una penetración rápida a través de las membranas celulares por difusión pasiva y la partición entre los lípidos y el agua de las células (ATSDR, 1995), provocando que su permanencia en el cuerpo sea por tiempo indefinido, (afinidad y bioconcentración en los tejidos ricos en grasas). Una vez incorporados al organismo experimentan una oxidación enzimática, llevada a cabo por el sistema de oxidasas de función mixta (MFO), ubicado principalmente en el hígado, que los convierte en epóxidos y en dihidrioles. Tales especies

químicas constituyen la forma genotóxicamente activa de los HPA's las cuales pueden formar aductos covalentes con proteínas y ácidos nucleicos celulares (Koss y Tesseraux, 1999).

Posteriormente los aductos del ADN formados pueden dar lugar a una mutación genética, de consecuencias carcinogénicas para el individuo expuesto. En consecuencia los HPA's son promutágenos que precisan de activación metabólica para poder ejercer acciones sobre el material genético (EHC, 1998).

Desde el punto de vista clínico, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, son elementos importantes que se han asociado con neoplasmas pulmonares, piel y tejido hematopoyético, así como aberraciones cromosómicas en leucocitos y leucemia (Ruíz y Rizo, 2007). Los HPA' se almacenan principalmente en hígado, riñones, grasa y en menor grado en bazo, glándulas suprarrenales y ovarios, sin embargo solo permanecen algunos días y después son excretados en las heces fecales y en la orina (ATSDR, 1995).

Cabe mencionar que numerosos estudios de contaminación de aire se han relacionado con los efectos en salud debido a sustancias químicas como: humo de tabaco, pesticidas y radiación entre otros muestran que el riesgo de desencadenar cáncer puede ser amplificado si la exposición comienza en edades tempranas, factor que se ha visto asociado con la talla corporal, dado que la misma dosis de una sustancia nociva puede causar en los niños un mal mucho mayor.

Otra razón es el hecho de que sus órganos están aún en el proceso de maduración y por lo tanto son más susceptibles. Por otro lado, un hecho importante es el tiempo de duración del tóxico en la vida del niño, puesto que el daño se manifiesta generalmente después de varios años, de la exposición, además de que los sistemas de reparación de daño molecular no son tan eficientes. (Perera, 1996; Mucci *et al*, 2004).

Muchos de los Hidrocarburos Polinucleares carcinogénicos, derivan de la estructura del Antraceno. La adición de otro anillo aromático a la molécula del Antraceno produce un agente fuertemente carcinogénico. Si a éste se le añaden grupos metilo, el resultado es un compuesto aún más cancerígeno (Albert, 1998).

Hay pocos datos disponibles sobre los efectos tóxicos del Naftaleno en humanos, pero exposiciones de corto tiempo a bajas concentraciones, puede causar irritación en los ojos y piel. Con un alto nivel de exposición (por arriba de 10 ppm) provoca náuseas, fatiga y dolor de cabeza. Si el Naftaleno es ingerido, es causa potencial de anemia hemolítica, una condición que involucra un colapso de las células rojas de la sangre. Una larga exposición del naftaleno a concentraciones mayores o iguales que 10 ppm, pueden causar efectos crónicos. El Naftaleno es un carcinógeno humano sospechoso y puede provocar daños al hígado y los riñones. La exposición crónica puede conducir a defectos reproductivos, incluyendo daño fetal y reducción de la fertilidad. Se han reportado altas incidencias en la formación de tumores en la piel y en los pulmones de personas que han estado ocupacionalmente expuestas a Naftaleno y a otros HPA's.

En estudios en animales, al exponer a conejos a altas concentraciones de Naftaleno, desarrollaron cataratas. En embriones de robalo "*boca-grande*", la  $LC_{50}$  del Naftaleno es 240  $\mu\text{g/L}$ . La Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ha publicado las regulaciones considerando los límites máximos permisibles de exposición. Estos límites son 10 ppm en promedio ponderado para una larga exposición y 15 ppm para una corta exposición. El Fenantreno es también un irritante de los ojos y la piel, con la luz solar se incrementan sus efectos debido a la fotosintetización. No hay datos disponibles de exposición oral e inhalación por humanos (Awata et al, 1998).

Uno de los hidrocarburos de mayor acción carcinogénica es el Benzo(a)Pireno. La contaminación atmosférica por este producto se ha relacionado con el desarrollo de cáncer pulmonar en los seres humanos, se ha comprobado que en animales produce daños citotóxicos y tiene efectos teratogénicos en animales de experimentación (Lewtas, 2007).

El Benzo(a)pireno ha sido encontrado en varios tipos de cereales, vegetales, frutas y carne. En los procesos de cocimiento a altas temperaturas, carbón para emparrillado o carbonizado. También es un componente de los productos del tabaco y es uno de los agentes causales de cáncer en el humo del cigarro. Este es convertido por enzimas dependientes del citocromo P450 a una variedad de óxidos que reaccionan con el ADN, mostrando actividad mutagénica (Shimada, 2008).

## 4.2.- RIESGOS A LA SALUD

Los HPA's son considerados como posibles carcinógenos en humanos, por lo que de acuerdo a la verificación periódica del grupo de trabajo de la EPA para la evaluación del riesgo carcinogénico, se les ha clasificado según su riesgo, como se observa en la siguiente Tabla 1. Cabe mencionar que en ella, solo se incluyen los hidrocarburos que de acuerdo a la literatura, se han identificado y clasificado con la suficiente evidencia epidemiológica, de acuerdo a la EPA (1993), por lo que no se incluye al grupo de compuestos; Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno y Benzo (ghi) perileno, de los cuales no se tiene evidencia suficiente. El benzo(a)pireno es el HPA's más estudiado y como es representativo del grupo, se acostumbra expresar los impactos ocasionados por hidrocarburos poliaromáticos en términos de equivalencia con el benzo(a)pireno (Pool-Zobel y Leucht, 1997).

**Tabla No. 1. Factor de Equivalencia Tóxica de los HPA's**

(HPAs)	Chemical Abstract Service (CAS) Number	IARC		Clasificación EPA	Factor Equiv Tóxica
		Animales	Humanos		
Benzo(a)Antraceno	56-55-3	S	2A	B2	0.100
Benzo(a)Pireno	50-32-8	S	2A	B2	1.00
Benzo(b)Fluoranteno	205-99-2	S	2B	B2	0.100
Benzo(k)Fluoranteno	207-08-9	S	2B	B2	0.100
Criseno	218-01-9	L	2B	B2	0.010
Dibenzo(a,h)Antraceno	53-70-3	S	2A	B2	5.000
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	193-39-5	S	2B	B2	0.1000

Fuente: Toxic Air Contaminant Document, Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHH), California Environmental Protection Agency's. 2A: Probable carcinógeno en Humanos; 2B: Posible carcinógeno para humanos B2: Datos humanos inadecuados pero suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales<sup>1</sup> La potencia de cáncer (o valor unitario de riesgo) es una estimación donde se relaciona la curva dosis-respuesta, a bajas dosis se calcula el riesgo de un organismo para desarrollar cáncer, debido a la exposición al compuesto a una dosis promedio diaria durante su vida (o concentración).

El factor de equivalencia tóxica fue propuesto por la EPA (1993) y por Nisbet y LaGoy (1992) y es una estimación aproximada del riesgo de cáncer provocado por los HPA's, calculada con base en la potencia relativa del BaP, cuyo factor de potencia es 7.3 mg/kg/día. Woodruff *et al.*, (2000), estimaron que el riesgo para contraer cáncer por inhalación debido al conjunto de HPA's es equivalente al 16% de la potencia<sup>1</sup> del Benzo(a)pireno, cuyo valor es de 2.1 ng/m<sup>3</sup> (EPA, 1994). Molina y Molina (2002) adoptaron las estimaciones de Woodruff *et*

al (2000) y aplicaron una potencia para los HPA's de  $0.3 \text{ ng/m}^3$  para estimar su riesgo en la Ciudad de México, considerando que sus concentraciones sean similares a las de Estados Unidos.

### **4.3 .- METABOLISMO DE LOS HPA's**

Los anillos aromáticos bencénicos, son compuestos no polares y de gran solubilidad en lípidos, lo que facilita la rápida penetración y transporte a través de las membranas. Son absorbidos por un mecanismo de difusión. Una vez asimilado, la mitad del benceno absorbido es enviado rápidamente a órganos con gran circulación sanguínea, como el hígado, los riñones o tejidos ricos en grasa, como los tejidos adiposos, el cerebro o su principal órgano blanco la médula ósea (ATSDR, 1989).

El metabolismo del benceno es un proceso que involucra múltiples rutas y la presencia de ciertas enzimas. El óxido de benceno es el primer producto y puede sufrir un rearrreglo espontáneo no enzimático para producir fenol, que puede posteriormente ser hidroxilado por la isoenzima p450, para formar hidroquinona o catecol. La hidroquinona puede ser oxidada a p-benzoquinona, la cuál es altamente reactiva y puede unirse de manera covalente a macromoléculas celulares, como el ADN o el glutatión. El benceno es metabolizado inicialmente en el hígado, órgano fundamental de desintoxicación y rico en enzimas biotransformadoras, donde sufre un proceso de oxidación a óxido de benceno de carácter inestable, que puede ser transformado en metabolitos fenólicos que después son excretados en la orina. Dentro de los metabolitos urinarios del benceno podemos incluir a los conjugados de sulfatos y glucorónidos, los ácidos mercaptúricos y residuos de aductos unidos en forma covalente al ADN (Snyder y Heidi, 1996), Anexo: Apèndice "A".

El destino metabólico de la p-benzoquinona, aún no ha sido completamente elucidado, puede reaccionar con glutatión para formar ácido premercaptúrico a partir de la hidroquinona originando ácido mercaptúrico o bien sufrir una autooxidación lenta, lo que llevaría a la producción de especies de oxígeno reactivas ocasionando un daño oxidativo en el ADN.

Otra vía alterna es que el óxido de benceno puede ser hidratado vía epóxido hidrolasa para generar 1,2 benceno dihidrodiol, que al ser oxidado por medio de la deshidrogenasa

forma catecol y subsecuentemente benzoquinona. (Snyder y Heidi, 1996). Por otro lado, también es probable que el óxido de benceno pueda reaccionar con el glutatión que es catalizado a su vez por el glutatión S-transferasa para formar el ácido premercaptúrico y los dihidrioles que a su vez reaccionan con el muconaldeido, para formar con la acción de la deshidrogenasa el ácido mucónico (Daiker *et al.*, 1996; Wilson y Suk, 2002).

El Benzo(a) pireno para ser carcinogénico requiere ser activado metabólicamente mediante el citocromo P450, convirtiéndose en Benzo(a)pireno diol epóxido. El diol epóxido forma un complejo ligado covalentemente a la guanina del ADN (Gelboin *et al.*, 1988 y Williams 1991), que en el enlace glicosídico, aparece como timina en la duplicación o regeneración del ADN. De esta forma el Benzo(a)pireno provoca una “mutación puntual” en el ADN. El BaP es detoxificado por la enzima glutatión transferasa, formada por los genes GST y glutatión S-transferasa, los polimorfismos en estos genes son biomarcadores de susceptibilidad metabólica (Binková *et al.*, 1996). (Anexo I; Apèndice B: Metabolismo del benceno).

#### **4.4 .- TECNICAS DE MONITOREO Y MEDICIÓN DE HPA´s EN EL AIRE**

Los métodos de monitoreo de partículas suspendidas con HPA's, se clasifican en exposiciones ocupacionales y ambientales. Los primeros incluyen las técnicas de muestreo integrado para la colección de material particulado a través de filtros y para la colección en forma gaseosa a través de material absorbente como los puffs, para largos periodos de muestreo.

Las técnicas de muestreo integrado son comúnmente utilizadas para volúmenes bajos. La colección de partículas suspendidas y la fase gas de los HPA's han sido llevadas a cabo por métodos de muestreo activo, en los cuales se utiliza un filtro y un medio adsorbente. Estos métodos dependen de la integración de la muestra, requiere de una bomba donde fluye el aire a través de un medio (filtros, adsorbentes, impregnaciones, trampa criogénica) en los cuales son retenidos los compuestos a cuantificar.

El muestreador de alto volumen (Hi-Vol) modificado; se ha empleado frecuentemente en el monitoreo de Partículas Suspensas Totales (PST), ha sido utilizado en Canadá y en Estados Unidos para coleccionar HPA's asociados a partículas. La cantidad de material coleccionado durante 24 horas de muestreo (típicamente) es suficiente para propósitos analíticos, especialmente para experimentos de bioensayos (Davis y Fellin, 1998); Figura 4.1.A.1



**Figura 4.1.A.1. Muestreador Hi-Vol modificado para HPA's del aire**

Los métodos de muestreo de los HPA's han variado de acuerdo al tipo de filtro y material adsorbente utilizado y los métodos de extracción tradicional de HPA's absorbidos de partículas más utilizados han sido Ultrasonido, Soxhlet y otros más modernos tales como la extracción de Fluido Supercritico (Maloni y Samara, 1994; Van Houdt et al, 1989; Matsushita et al, 1992) y como método de concentración se utiliza un Rotoevaporador.

La Técnica de extracción por Soxhlet involucra la inversión de tiempos prolongados de extracción que pueden ir desde 4 hasta 24 horas, lo que implica un riesgo mayor de contaminación y una probabilidad alta de perder analitos por efecto de la temperatura y en cambio con el método de sonicación, se reducen considerablemente los tiempos de extracción

y las pérdidas de los compuestos y el riesgo de contaminación es mínimo (Mastral y Callén, 2000).

El efecto de la extracción por Sonicación y Soxhlet sobre los HPA's recuperados han sido estudiados en México por Amador (2003), quien reportó una alta recuperación de HPA's, con el método de extracción por sonicación, siguiendo la metodología TO-13A de la US-EPA; con tiempos de recuperación de 1.5 horas y con un coeficiente de variación del 29.3%, menor que el obtenido mediante el método Soxhlet (51.1%).

Las muestras son usualmente extraídas y limpiadas con solventes orgánicos, siguiendo los protocolos rigurosos apegados al método TO-13A y analizando los HPA's con técnicas analíticas cromatográficas de gases. Los detectores más frecuentemente utilizados en Cromatografía de Gases son por captura de electrones e ionización de flama. Estos métodos son muy sensibles y pueden identificar y cuantificar cada HPA's, (Davis y Fellin, 1998).

#### **4.5 .- BIOMARCADORES: INDICADORES DE DAÑO GENÉTICO**

La exposición a agentes genotóxicos puede originar una variedad de efectos, que se expresan inmediatamente o producen algún tipo de alteración que puede tardar años en manifestarse. El creciente aumento de la exposición a agentes potencialmente genotóxicos genera la necesidad de identificar, caracterizar y evaluar el riesgo con el objetivo de establecer medidas para la reducción y prevención de riesgos individuales y poblacionales (Wang *et al.*, 2001).

Los biomarcadores se utilizan para identificar cambios moleculares o celulares en los sistemas biológicos atribuibles a exposiciones ambientales. El daño genético es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas en el organismo durante el desarrollo, el agente genotóxico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares.

Una vez dentro de la célula, el agente puede reaccionar por sí mismo (acción directa), ó bien puede ser activado por las enzimas metabólicas (acción indirecta). Es entonces cuando se origina una interacción con el ADN, que se puede reparar eficientemente o fracasar, de

manera tal que el daño genético inicial se expresará ó no en las diferentes estirpes celulares (Rodríguez, 1998 y Shugart, 2000).

Si la exposición produce alteraciones tempranas o iniciales en los individuos, antes del desarrollo del impedimento o la enfermedad, estos cambios podrían convertirse en señales o marcadores, que pueden ser evaluados mediante estrategias adecuadas y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo en modelos experimentales o en grupos humanos expuestos (NRC, 1989).

Con el fin de identificar alteraciones tempranas, la epidemiología molecular ha planteado la utilización de marcadores biológicos (biomarcadores) en las células de individuos en riesgo, definiendo a un biomarcador como un indicador de la variación de los componentes y procesos bioquímicos ó celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas (Ostrosky, 1997)

Los biomarcadores son los cambios en la respuesta biológica que puede estar relacionada a una exposición o a algún efecto tóxico en el ambiente. De hecho pueden proveer información temprana del impacto de los xenobióticos sobre los seres humanos, ya que permiten detectar los eventos que ocurren entre la exposición y la enfermedad (Salazar *et al.*, 1996).

De acuerdo a su definición, los biomarcadores pueden encontrarse en diferentes niveles biológicos y se clasifican en 3 tipos: de exposición, de efecto y susceptibilidad (Salazar *et al.*, 1996; Kyrtopoulos, 2006):

a) Los **marcadores de exposición** son aquellos que miden la concentración de agentes químicos o de sus metabolitos en los fluidos biológicos o en los tejidos; poniendo de manifiesto que el organismo tuvo contacto con estos agentes (EPA, 1986; Gonsebatt, 1996; Perera, 1996).

b) Los **marcadores biológicos de susceptibilidad** son indicadores de la existencia de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico. Dicha capacidad depende de su pool

genético, el que contiene múltiples formas de ciertos genes que desintoxican carcinógenos o reparan el daño (Salazar *et al.*, 1996; Perera, 1996).

c) Por último, los **marcadores de efecto** son las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo, que dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud y son producto de la exposición a un agente determinado de tipo exógeno (NCR, 1989; Gensebatt, 1996: Gensebatt *et al.*, 1995). Se clasifican en: citotóxicos, que se refieren al daño y muerte celular y en citostáticos que se reflejan en los incrementos o retrasos en la síntesis del ADN y pueden causar muerte celular, mutaciones y cáncer (Tice e Ivett, 1985; Gensebatt, 1994). En esta categoría también se incluyen alteraciones en las funciones de los tejidos blancos después de la exposición cambios en los órganos y tejidos diferentes de los sitios que son críticos para la acción de la sustancia tóxica (NRC, 1989).

Estos marcadores pueden servir como señales de alarma, ya que constituyen un dosímetro para guiar la intervención en cuanto a reducir o prevenir la exposición. Un tejido afectado por una sustancia tóxica puede exhibir una función alterada aún si el individuo no presenta manifestación de daño, es aquí en donde estas funciones modificadas pueden en algunos casos determinarse en pruebas, particularmente con métodos bioquímicos ó biológicos (Ostrosky *et al.*, 1991).

Cualquier cambio no programado en la estructura del ADN puede potenciar consecuencias biológicas serias. Algunas sustancias químicas y/o agentes físicos, son clasificados como “genotóxicos”, esto quiere decir que tienen la capacidad de interactuar con la estructura del ADN y dañarla. El daño específico a la estructura del ADN puede ser revisado como un “biomarcador de exposición”. Cualquier evento que ocurra después de iniciar la interacción del genotóxico con el ADN se le denomina “biomarcador de efecto”, muchas sustancias químicas tales como los HPA's, atacan las moléculas del ADN, por ejemplo al formarse ciertos enlaces covalentes en las moléculas orgánicas dan origen a la formación de aductos.

Tanto en los biomarcadores de efecto como en los de exposición; las modificaciones estructurales en las moléculas del ADN, llevan una huella específica de la respuesta genotóxica. (Shugart, 2000).

Muchos genotóxicos causan rompimientos en las cadenas del ADN directamente. Por ejemplo, la formación de radicales libres pueden resultar en el rompimiento de ligandos tipo fosfodiesteres dentro de la molécula del ADN. Los genotóxicos pueden interferir en las actividades de los procesos normales del ADN, tales como la replicación, metilación y reparación en los cuales pueden resultar mutaciones (Albertini *et al.*, 1996).

En la detección de la inducción de daño oxidativo y rompimientos en el ADN, se utilizan ensayos citogenéticos específicos como el Intercambio de Cromátides Hermanas y el Ensayo Cometa. Cabe mencionar que la estabilidad de los biomarcadores respecto al momento de la exposición debe ser uno de los aspectos más importantes a considerar en los estudios de biomonitorio (Wang, *et al* 2001; Bonassi y Au, 2002).

Los ensayos o pruebas de genotoxicidad, se han clasificado según las características de los eventos que pueden detectar, de tal forma que hay cuatro grupos: mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, transformación morfológica y daño al ADN (Brusick, 1987; Stromberg, *et al*, 2001).

Para detectar daño al ADN dentro de esta clasificación, los marcadores de efecto genotóxico principalmente usados son; aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos y ensayo cometa o electroforesis unicelular en microgel, siendo esta última las más utilizada en los últimos años (Högstedt *et al.*, 1991; Carrano y Natarajan, 1988; Betancourt *et al.*, 1995; Gonsebatt *et al.*, 1995; Valverde, 1997; Gonsebatt *et al.*, 1997; Kirsch, 1997; Montero, *et al* 1997; Singh *et al.*, 1988).

La aplicación de estas metodologías hace posible distinguir a los individuos expuestos de los no expuestos, discriminar entre los expuestos a los más susceptibles. Así como evaluar los efectos de bajas dosis de mezclas complejas a sustancias tóxicas.

La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis de exposición y de la función que desempeñe en los tejidos afectados del organismo (Gonsebatt, 1996).

Finalmente se pueden considerar a los biomarcadores citogenéticos como indicadores tempranos de “riesgo de cáncer” (Carrano y Natarajan, 1988; Kyrtopoulos, 2006). Por presentar una buena correlación entre el aumento en la frecuencia de daño a nivel cromosómico producidos por una determinada exposición y el incremento en el riesgo de contraer cáncer.

## 5 .- METODOLOGÍA

### 5.1 .- DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO

El presente estudio fue realizado en diversas regiones del estado de Tabasco, localizadas en el sur del Golfo de México. Los puntos de muestreo fueron establecidos en sitios con diferente tipo de actividad (agrícola, urbana y petrolera), (Fig No. 1), para comparar los valores encontrados de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos presentes en la Atmósfera con los datos registrados en los niveles de daño genotóxico generados en la aplicación de una batería de biomarcadores de daño temprano al ADN en las poblaciones infantiles de las diferentes regiones de estudio.



Fig No. 5.1.A. Localización de Sitios de Muestreo en el Estado de Tabasco.

El Mapa señala los puntos de muestreo que se establecieron en función del riesgo potencial de exposición a la influencia de la industria petrolera; se localizaron en los

municipios de la comunidad de Gregorio Méndez 1ª Sección, Municipio de Comalcalco, Comunidad de Nuevo Torno Largo, Municipio de Paraíso en el Estado de Tabasco. La comunidad de San Miguel 1ª. Sección, Municipio de Reforma en el Estado de Chiapas, colindante con los límites del Estado de Tabasco y Villahermosa, en el Municipio del Centro. Así como los puntos de muestreo clasificados sin influencia de actividad industrial petrolera (controles) y fueron establecidos en las comunidades de Netzahualcóyotl, en el Municipio de Balcan, Tabasco y la comunidad de Uquiná- la Loma en el municipio de Balancàn.

### **5.1.1. Comunidad de Gregorio Méndez 1a Sección, Comalcalco, Tabasco.**

En el municipio de Comalcalco se localiza la comunidad de Gregorio Méndez 1ª sección, localizada a 18°15'02'' LN y 93°14'07'' LW a 10 msnm. Presenta un sistema topomorfa de llanura, en el cual el clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (García, 1964). La temperatura media anual es de 26.4°C, con promedio anual de 29°C (en el mes de Mayo) y Temperaturas máximas de 30.5°C. La precipitación pluvial anual promedio es de 1933.7 mm. (INEGI, 2000). Anexo: Apéndice "C".

**a) Fuentes de emisión:** Las principales fuentes de emisión de hidrocarburos, en la vecindad de la comunidad de Gregorio Méndez 1ª sección, son las Baterías de Separación, en donde se llevan a cabo actividades de recolección, separación y almacenamiento de Hidrocarburos, que fluyen en una Batería de separadores mediante un conjunto de válvulas.

La etapa de separación se lleva a cabo mediante dispositivos mecánicos en los que se realiza el proceso de separación del gas, aceite, agua y sedimentos y van conectados al colector general de gas que descarga, por un lado a la estación de compresoras y por otro al quemador.

El almacenamiento de hidrocarburos contiene vapores y aceite y válvulas. El aceite que proviene de los tanques es enviado a un centro mayor de recolección, que puede ser principalmente una refinería o un puerto de embarque. En lo que se refiere al gas, este fluye a una estación de compresoras en donde se envía a las plantas de proceso. (Del Ángel González, 1998).

**b) Parque vehicular:** En el municipio de Comalcalco se registraron hasta diciembre de 2000, el parque vehicular que se muestra en la siguiente Tabla:

**Tabla 5.1.1.** Parque vehicular del municipio de Comalcalco. FUENTE: INE, 2000

AUTOMÓVILES				CAMIONES PARA PASAJEROS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
7219	93	83	7043	721	41	420	260
CAMIONES DE CARGA				MOTOCICLETAS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
4439	601	131	3707	321	0	0	321

**c) Vientos dominantes:** Los datos meteorológicos del Municipio de Comalcalco son los siguientes: vientos dominantes para el periodo Noviembre-Abril son 50% de frecuencia del Noreste (NE), 48% del Sureste (SE) y 2% del Noroeste (NW). Para el periodo Mayo-October, los vientos dominantes son, 60% de frecuencia del Noreste (NE), 30% del Sureste (SE) y 10% del Noroeste (NW), (INEGI, 2,000).

### 5.1.2. Comunidad de Nuevo Torno Largo Paraíso, Tabasco.

La comunidad de Nuevo Torno Largo se encuentra ubicada en el Municipio de Paraíso que se encuentra localizado a 18°25'08'' LN y 93°10'00'' LW a 10 msnm. Esta población presenta un sistema topomorfa de llanura con dunas, presenta un clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (García,1964).

La temperatura media anual es de 27.1°C y la máxima de 32.4°C. La precipitación pluvial anual promedio es de 1933.7 mm., (INEGI, 2000), Anexo: Apéndice "D".

**a) Fuentes de emisión:** La comunidad de Nuevo Torno Largo, se encuentra aproximadamente a 1000 m de la Terminal Marítima Dos Bocas (TMDB), donde se lleva a cabo la recepción, almacenamiento y exportación del crudo proveniente de los complejos marinos de producción Akal-C, Nohoch-A, Pool-A y Abkatum. Además de que cuenta con baterías en Puerto Ceiba, Cunduacán, Castarrical y Pijije, para el envío y compresión del gas a través de ductos hacia Cunduacán y de crudo hacia Nuevo Teapa, otra de las actividades es el

quemado de gases de desecho. Por otro lado se produce energía eléctrica mediante generadores accionados por gas o diesel en una turbina mixta.

Otro de los procesos es el de Almacenamiento de diesel para accionar y abastecer motores de buques. La TMDB cuenta con una estación de servicio para suministro de carburantes a vehículos, una planta de tratamiento de efluentes y un puerto de carga para suministro a plataformas.

Las principales fuentes de contaminación atmosférica detectadas en la TMDB son los quemadores elevados de 24 y 65 metros de altura, que se utilizan como dispositivos de seguridad para eliminar el gas de proceso excedente que no puede ser manejado (gas excedente que se quema), en el proceso también se emplea gas dulce (gas natural sin ácido sulfhídrico) para mantener encendido el piloto del quemador con un gasto de 0.1 millones de pie cúbicos por día. Otras fuentes de emisión son calderas, motores de combustión interna y motocompresoras.

Durante el proceso de la TMDB al realizar la estabilización, separación y rectificación del crudo, se obtiene gas el cual se comprime y envía a Cunduacán para su posterior procesamiento.

En los quemadores se llevan a cabo procesos de combustión, utilizando gas amargo, originando en la combustión de contaminantes como Bióxido de Azufre ( $\text{SO}_2$ ), Monóxido de Carbono (CO), Óxidos de Nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), Partículas (PST y  $\text{PM}_{10}$ ) e Hidrocarburos no quemados (HCs).

**b) Parque Vehicular.** En el municipio de Paraíso se registraron hasta Diciembre de 2000, el parque vehicular que se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 5.1.2. Parque vehicular del municipio de Paraíso. FUENTE: INE, 2000

AUTOMOVILES				CAMIONES PARA PASAJEROS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR
4345	25	87	4233	182	26	102	54
CAMIONES DE CARGA				MOTOCICLETAS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR
2075	160	75	1840	45	0	0	45

c) **Vientos dominantes.** La estación meteorológica determina que los vientos dominantes para el periodo Noviembre-Abril fueron el 50% de frecuencia Noreste (NE), 48% frecuencia Sureste (SE) y 2% Frecuencia del Este (E). Para el periodo Mayo-Octubre, los vientos dominantes son, 50% de frecuencia del Noreste (NE), 40% del Sureste (SE) y 10% del Norte (N). La dirección del viento regional dominante para la zona en el período Noviembre-Abril son Noroeste y Sureste, mientras que para el período Mayo-Octubre son del Noreste (INEGI, 2000).

### 5.1.3 Comunidad de San Miguel 1a Secc., Municipio de Reforma, Chiapas:

En el municipio de Reforma del Estado de Chiapas, se monitoreó a la comunidad de San Miguel 1ª. Sección a 2 Km. del CPG Cactus (Complejo Procesador de Gas), esta población se encuentra localizada a 17°57' LN y 93°11' LW a 20 msnm. Esta comunidad presenta un sistema topografía de lomeríos, el clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (García, E., 1964). La temperatura media anual es de 26.1°C, con máximas de 28.6 en el mes de mayo y la temperatura mensual mínima es de 23.1°C en el mes de febrero. La precipitación pluvial anual promedio es de 2134.7 mm. (INEGI 2000). Anexo: Apéndice "E".

a) **Fuentes de emisión.** La comunidad de San Miguel 1ª. Sección en el municipio de Reforma en el Estado de Chiapas, se encuentra a 2 Km. del Complejo Petroquímico de PEMEX de Gas (CPG) Cactus.

El Complejo Procesador de Gas Cactus está ubicado en el Estado de Chiapas, a 10 kilómetros de la cabecera municipal de Reforma, Chiapas, limita con el Estado de Tabasco y ocupa una superficie de 312.5 hectáreas.

Las actividades de este centro de trabajo son procesamiento de gas natural amargo para eliminar las impurezas y separar sus componentes. A fin de lograr lo anterior, el C.P.G. Cactus realiza los siguientes procesos: Endulzamiento de Gas Natural Amargo, Recuperación de Azufre, Recuperación de Licuables y Fraccionamiento de Hidrocarburos.

La distribución de materia prima hacia las diferentes plantas de proceso es realizada por medio del paquete de Separación de Gas Amargo; las cuales se reciben por tubería subterránea proveniente de las Baterías de Separación y de los Sistemas de Comprensión de los campos de explotación del mesozoico y del Golfo de Campeche. Los productos intermedios del C.P.G. Cactus, junto con los del C.P.Q. Nuevo Pemex, son enviados a través de las trampas de diablos, hacia otros centros de procesamiento.

Los productos terminados son enviados a las siguientes partes: El gas residual (gas seco) se envía a través del Sistema Troncal de Ductos Sureste de Gas para su distribución y venta; el Gas L.P. es enviado a la Terminal Marítima de Pajaritos en Veracruz y a través de dos ductos, se envía a la Terminal local de Ventas Cactus para distribuirse por medio de autotanques a los estados del sureste.

Las fuentes de emisión de contaminantes a la Atmósfera son: Quemadores Tipo Fosa y Tipo Vela, Quemadores elevados de 35 m. y 90 m. de altura, incineradores y rehervidores.

En el C.P.G. se pueden identificar dos tipos de fuentes de emisión atmosférica que serían los compuestos orgánicos volátiles fugitivos dentro del CPG e Hidrocarburos totales volátiles fugitivos en los diferentes procesos que se llevan a cabo.

Las fuentes fijas de emisión en el C.P.G. son: las chimeneas de calderas y calentadores de las Plantas Criogénicas Modulares, hornos, incineradores y rehervidores de la Planta Fraccionadora, así como los quemadores elevados y de fosa.

**Tabla 5.1.3. Parque vehicular del Municipio de Reforma Chiapas. Fuente INE 2000**

AUTOMOVILES				CAMIONES PARA PASAJEROS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
2573	0	121	2452	96	8	57	31
CAMIONES DE CARGA				MOTOCICLETAS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
2423	8	79	2336	50	0	0	50

c) **Vientos dominantes.** La estación meteorológica se encuentra en la cabecera municipal de Reforma Chiapas, tiene vientos dominantes en el periodo Noviembre-Abril, con dirección Sureste (SE) y Noreste (NE). Para el periodo Mayo-Octubre, los vientos dominantes tienen una frecuencia Norte (N) del 60% y 40% frecuencia Sureste (SE). (INEGI, 2,000).

#### 5.1.4. Comunidad de Netzahualcóyotl Municipio de Balancàn, Tabasco.

La comunidad de Netzahualcóyotl en el Municipio de Balancàn, es considerada como sitio control, debido a que no hay influencia de la industria petrolera; se encuentra localizada a 17°42' LN y 91°27' LW a 10 msnm. Presenta un sistema topomorfa de lomeríos con llanura, el clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (García., 1964). La temperatura media anual es de 28.5°C, con temperatura promedio de 31.0°C en el mes de mayo y una temperatura promedio mínima de 25.6°C en el mes de enero y una máxima de 32.6°C. Presenta una precipitación pluvial anual promedio de 1398.1 mm (INEGI, 2000). Anexo: Apéndice "F".

a) **Fuentes de emisión.** Las principales fuentes de emisión de HPA's en el área de estudio son la quema de residuos domésticos, incendios forestales, combustión de leña para la preparación de alimentos y fuentes móviles que no se contemplan en las cifras del Parque Vehicular como son principalmente tractores y motoconformadoras. En este sitio no existen fuentes industriales cercanas, la única es un Ingenio azucarero (Hermenegildo Galeana), que se encuentra a 40 kilómetros en el municipio de Tenosique.

b) **Parque Vehicular.** El municipio de Balancàn registró hasta Diciembre de 2000, el parque vehicular se muestra en la siguiente Tabla:

Tabla 5.1.4. Parque vehicular del Municipio de Balancan. FUENTE: INE, 2000

AUTOMÓVILES				CAMIONES PARA PASAJEROS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
1091	0	47	1044	147	2	65	80
CAMIONES DE CARGA				MOTOCICLETAS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
1441	8	63	1370	58	0	0	58

c) **Vientos dominantes.** La estación meteorológica se encuentra en la cabecera municipal de Balancan, los vientos dominantes para el periodo Noviembre-Abril presentaron una frecuencia del 75 % Sureste (SE) y una frecuencia del 25% Noreste (NE). Para el periodo Mayo-October, los vientos dominantes tuvieron una frecuencia del 55% con dirección Sureste (SE) y una frecuencia de 45% en dirección Noreste (NE), (INEGI, 2,000).

### 5.1.5. Colonia Las Gaviotas, Centro, Tabasco.

El municipio del Centro se consideró como sitio urbano de control y se monitoreo la Colonia Las Gaviotas que se encuentra localizada a 17°59' LN y 92°56' LW a 6.5 msnm. Esta población presenta un sistema topomorfa de llanura, con clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (García, 1964). La temperatura media anual es de 27.2°C, la temperatura promedio de 29.9°C en el mes de mayo, con mínimas de 23.9°C en el mes de enero y máximas de 30.4°C. La precipitación pluvial anual promedio es de 2032.5 mm. (INEGI, 2001), Anexo: Apéndice "G".

a) **Fuentes de emisión.** En cuanto a fuentes fijas de contaminación, en la Ciudad de Villahermosa se localiza una zona empresarial, ubicada al Noreste de la Ciudad, al norte de la Av. Universidad, en el km. 1 de la carretera Villahermosa-Frontera. Otro aporte importante de contaminación es el proveniente de las instalaciones petroleras, que se encuentran principalmente en la zona Noroeste de la Ciudad, en donde se localizan los principales pozos de extracción (Campo Carrizo, Platanal y Rio Nuevo).

En lo referente a la emisión de hidrocarburos, estos son emitidos tanto de fuentes móviles como fuentes fijas, producto de la combustión incompleta, generando a la atmósfera cantidades considerables de CO, HCs y CO<sub>2</sub>.

En cuanto a carga vehicular, la Ciudad cuenta con 4 ejes de mayor afluencia vehicular, los cuales son los siguientes: Av. Adolfo Ruíz Cortinez, Av. Gregorio Méndez, Periférico Carlos Pellicer Cámara (estos cruzan toda la ciudad), Paseo Tabasco, Paseo Usumacinta, Av. Universidad y Av. 27 de febrero.

**b) Parque Vehicular.** En el municipio del Centro se registró hasta Diciembre de 2000, el parque vehicular que se muestra en la siguiente Tabla:

**Tabla 5.1.5. Parque vehicular del Municipio del Centro.** FUENTE: INE, 2000

AUTOMOVILES				CAMIONES PARA PASAJEROS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
62838	1802	1898	59138	5264	575	1921	2768
CAMIONES DE CARGA				MOTOCICLETAS			
TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PARTICULAR	TOTAL	OFICIAL	PUBLICO	PART
30570	3061	415	27094	3012	69	0	2943

**c) Vientos Dominantes.** De la estación meteorológica No. 27-022, ubicada a 92°58'00'' y 17°58'00'' en la ciudad Villahermosa, con más de 30 años de registros, se determina que los vientos dominantes para el periodo Noviembre-Abril son 55% de frecuencia del Este (E), 55% del Noreste (NE), 10% del Oeste (W) y registrándose 9% de calmas. Para el periodo Mayo-Octubre, los vientos dominantes son, 50% de frecuencia del Este (E), 25% del Noreste (NE), 15% del Oeste (W) y 10% de calmas. La dirección del viento regional dominante para esta zona en el periodo Noviembre-abril son Noreste y Sureste, mientras que para el período Mayo-Octubre son del Nornoreste (NNE) y Sureste (SE). (INEGI, 2000). Se presenta la simbología de las áreas de localización de cada sitio de estudio en el Anexo: Apéndice "H"

## **5.2 .- MONITOREO DE HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS EN LA ATMOSFERA DEL AREA DE ESTUDIO: FASE GAS Y FASE PARTICULA.**

### **Procedimiento para el muestreo de los HPA`s: Colección de la muestra**

Las metodologías para determinar HPA`s en la atmósfera fueron las validadas por la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América), ya que en México no existen normas ni métodos reconocidos para la determinación de HPA`s en el aire.

El método utilizado para el muestreo, detección y cuantificación de los HPA`s en muestras de aire fue el método TO-13-A de la U.S.A Environmental Protection Agency (USEPA, 1999) y el método analítico de HPA`s fue el: EMSL/RTP-SOP-MDAD-015 (Standard operating for ultrasonic extraction and analysis of residual benzo(a) pyrene from Hi-Vol filters via thin-layer chromatography, USEPA) utilizado para la extracción de HPA`s. (Method TO-13, USEPA 1997).

Cabe señalar que ambos métodos son usualmente empleados para el muestreo y análisis de aire, porque proporcionan procedimientos explícitos en las técnicas, estableciendo límites de detección y criterios de calidad.

Antes del monitoreo de los HPA`s, el sistema de muestreo integrado por un Hi-Vol modificado (Graseby) fue calibrado y ensamblado.

### **5.2.1. Montaje y calibración del sistema de muestreo (TO-13); Equipo Hi-Vol Y Ensamble del equipo.**

El proceso de calibración del equipo de monitoreo Hi-Vol modificado, se desarrolló de la siguiente manera: primero se calibró solo el motor del equipo por medio de un rotámetro a condiciones ambientales estándar (Presión y Temperatura) en el Laboratorio de la Sección de Contaminación Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM . (Figura 5.1.A.2 Anexo: Apéndice "I").

Posteriormente se calibró el motor del equipo Hi-Vol conectado a una bomba de vacío, mediante el cual pasaba un flujo de aire que era ajustado por medio de una válvula de tipo venturi y con el medidor magnético, se registraron lecturas de 4 a 10 scfm ( $0.114$  a  $0.285$   $m^3 \text{ min}^{-1}$ ) según los procedimientos establecidos en la metodología TO-13 de la USEPA. La calibración del rotámetro y el medidor magnético se aprecian en los apartados en donde se describe el procedimiento estándar y los resultados se presentan en la Figura 5.1.A.3 y Anexo: Apéndice “J”.

### **5.2.2. Materiales para la colección.**

Después que el sistema de muestreo ha sido ensamblado y calibrado, puede ser utilizado para coleccionar las muestras de HPA's. El muestreador fue localizado en un área sin obstrucción para el flujo de aire, a una altura mínima de 2 metros, para evitar cualquier obstáculo alrededor.

Antes de colocar los materiales colectores, se removi6 el módulo de muestreo para enjuagar todas las áreas que tengan contacto con la muestra utilizando hexano grado reactivo. Esperando que se evapore todo el hexano del módulo antes de llevar a cabo el muestreo.

Con el muestreador apagado, se ajustó la válvula de control al flujo deseado (con referencia a la calibración y la lectura de la aguja del medidor magnético, verificando que la lectura inicial fuera cero. Se registraron en una hoja de datos de campo; la temperatura ambiente, presión atmosférica, tiempo transcurrido de muestreo, número de filtro y número de absorbente, etc. La lectura en el medidor magnético fue tomada al principio y al final del período de muestreo.

El módulo de muestreo ha sido desarrollado por la USEPA, consiste en un filtro de fibra de cuarzo (QFF) para el componente particulado y un cartucho muestreador de vidrio con un filtro como medio absorbente de 3 pulgadas de diámetro de poliuretano (PUF) con densidad de  $0.020 \text{ g m}^{-3}$ , para tomar el componente en forma de gas de las muestras de aire de HPA's.

Los materiales de muestreo (filtros y medios absorbentes) se acondicionaron y limpiaron previamente antes del muestreo que se describe a continuación :

Cada una de las muestras fueron tomadas durante 24 horas, en periodos de 7 días consecutivos, en cada sitio de muestreo con un equipo modificado de Altos Volúmenes (Hi-Vol, Marca Graseby, Inc).

### **5.2.3. Preacondicionamiento de Materiales para la colección de HPA's**

Los materiales utilizados para el monitoreo fueron; filtros de fibra de cuarzo (QFF) para coleccionar los HPA's en fase particulada, tenían dimensiones de 102 mm. de diámetro (marca Whatman tipo QMA 4) y fueron colocados en la parte superior del equipo Hi-Vol modificado. Y los filtros de poliuretano (filtros puff) utilizados para coleccionar los HPA's en la fase gas, tenían un grosor de 3 pulgadas y una densidad de  $0.020 \text{ g/m}^3$  (6 cm), tamaño que corresponde al diámetro interno del dispositivo de vidrio del equipo.

**a) Filtros de Cuarzo (QFF)** Los filtros de cuarzo fueron puestos en un desecador, para eliminar humedad antes del muestreo y fueron envueltos en papel aluminio durante 24 horas. Y se colocaron durante otras 24 horas en una estufa a  $200^{\circ}\text{C}$ . Se etiquetaron y se registró el peso inicial de cada filtro.

**b) Filtros de esponja de poliuretano (PUFF)** Los filtros fueron lavados con acetona grado reactivo en un baño ultrasónico, durante 3 veces consecutivas, durante 20 minutos de sonicación. Fueron escurridos y puestos en frascos ámbar limpios (previamente lavados con éter-hexano). Después se secaron con una bomba de vacío hasta que se volatilizó la acetona. Los frascos ámbar conteniendo los filtros lavados y secados, fueron etiquetados registrando el día de la preparación.

Se consideraron blancos en cada muestreo de filtros de cuarzo y puff, es decir material que era transportado en las mismas condiciones que el material de muestreo pero no era colocado en el equipo de muestreo y después era transportado y analizado en las mismas condiciones que las muestras de HPA's. Al término del muestreo, se guardaron en el mismo papel aluminio y frasco ámbar en donde habían sido transportadas antes del muestreo.

El material fue guardado para su transporte al laboratorio en una nevera con hielo, para evitar la volatilización de la muestra. El tiempo hasta el análisis cromatográfico de las

muestras de HPA`s, no debe exceder 24 horas. En cada muestreo se registraron los datos de meteorología del sitio de muestreo utilizando una estación de meteorología portátil (Davis Weather Link II), tomando lecturas cada 15 minutos para minimizar la pérdida de datos. Los parámetros medidos fueron presión atmosférica, temperatura ambiente, dirección, velocidad de viento y precipitación pluvial.

#### **5.2.4. Identificación y Cuantificación de HPA`s: Extracción, concentración y limpieza de las muestras en fase gas y Partícula.**

Las muestras de HPA`s en cada medio colector PUFF, fueron removidas por medio de una mezcla de éter-hexano (9:1) y las muestras de HPA`s de cada QFF fueron removidas con diclorometano, utilizando un baño ultrasónico (Branson 3510). Las muestras extraídas fueron concentradas y después fraccionadas en columnas empacadas con alúmina, sílica-gel y sulfato de sodio anhidro. La fracción de HPA`s fue obtenida lavando las columnas con una mezcla de hexano-diclorometano (9:1).

**a) Método de Sonicación; Limpieza-Extracción de HPA`S de los medios Colectores:** El método de extracción de HPA`s utilizado fue el EMLS/RTP-SOP-MDAD-015 ; a través de un baño ultrasónico, ya que se minimizan los volúmenes de reactivos y el tiempo de extracción. Se utilizan 40 ml de diclorometano para extraer el filtro de cuarzo (QFF) y 100 ml. de hexano ambos grado HPLC, con un tiempo de sonicación de 10 minutos.

**b) Método de Rotavapor: Concentración de Compuestos Orgánicos**  
Concentración de las Muestras de HPA`s: Las muestras fueron concentradas a 4 ml por medio de un rotavapor, a una temperatura de 60°C, vacío de 330 mbar y con una rotación de 70 rpm. Una vez concentradas las muestras, son guardadas en viales ámbar y almacenadas en un congelador a -20°C para su conservación y posterior limpieza.

**c) Limpieza y fraccionamiento de las muestras de HPA`s** Todas las muestras fueron limpiadas para remover las impurezas y obtener la fracción de los HPA`s limpios en columnas empacadas. Para el fraccionamiento de las muestras, se utilizò el método 610 de la USEPA, empacando columnas con sílica- gel (40-140 mesh), alúmina grado reactivo y sulfato

de sodio anhidro granular. Al ser empacada la columna, se vertió la muestra sobre la columna con sílica- gel, diluyendo la fracción de los HPA's con 20 ml. de hexano-diclorometano 9:1 v/v.

Obtenida la fracción de los HPA's, cada muestra fue concentrada a 2 ml en el rotavapor, a una temperatura de 60°C, vacío de 330 mbar y con una rotación de 70 rpm. Una vez concentradas las muestras fueron guardadas en viales color ámbar y llevadas a sequedad total con nitrógeno de ultra alta pureza y almacenadas en un congelador a -20°C, para su posterior análisis cromatográfico.

### **5.2.5. Evaluación Analítica de HPA'S en fase partícula y fase gas (Método TO13 US-EPA), condiciones de operación del cromatógrafo de gases.**

Las muestras de HPA's, se analizaron por cromatografía de gases en un sistema Hewlett-Packard 5890 con detector de ionización de flama (GC/FID) que funcionaba con una columna capilar Hewlett-Packard 19091B-112 de 5% de fenil-metil-siloxano (25 m x 0.32 milímetros D.I. x 0.52 µm de espesor de película,). Se utilizó helio de ultra alta pureza (praxair) como gas acarreador con un flujo de 2.5 mL s<sup>-1</sup>. Las inyecciones se realizaron en el modo "splitless" durante 45 s. Se programó una rampa de temperatura para la columna; 80 °C-2 min, incrementando en 5 °C/min hasta 300 °C-10 min.

Las muestras fueron reconstituidas con 200 µl de Isooctano y el volumen de la muestra inyectada fue de un microlitro (Davis et al 1998). Las concentraciones de los HPA's detectadas fueron referidas al volumen de aire de la muestra, corregido a presión y a temperatura estándar. Se utilizaron gases Hidrógeno, Helio y Aire Zero de calidad de ultra alta pureza.

La calibración y análisis del equipo de cromatografía de gases, se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

Columna: SPB-5, 0.25 µm 5% fenil con metil siloxano (30 m x0.25 mm DI)

Gas transportador: Helio, 1 mL/ min

Temperatura del detector: 280°C.

Temperatura del inyector: 280°C  
Temperatura del Horno: 80°C – 2 min, 5 °C/ min  
Rampa térmica 1: 8°C/min  
Rampa térmica 2: 5°C/min  
Rampa térmica 3: 2°C/min.  
Temperatura final: 280°C.  
Modo de inyección: 1 µL/ min, Splitless. 1 min a 280 °C.  
Tiempo de análisis: 40 minutos  
Línea de Transferencia: 280 °C  
Fuente de iones: 230 °C.  
Cuadrupolo: 150 °C  
Modo: SIM, 2.8 ciclos/ min

### **5.2.6. Curva de Calibración para el análisis de HPA`s por cromatografía de Gases.**

Se analizaron 16 HPA`s considerados por el método TO-13A de la Agencia de Protección Ambiental de EUA como contaminantes prioritarios desde el punto de vista de la salud, debido a sus efectos potencialmente mutagénicos y cancerígenos (EPA 1999).

La calibración del equipo se llevó a cabo con un estándar externo de referencia que contiene 100 µg/ml de cada uno de los 16 HPA`s, establecidos como prioritarios desde el punto de vista de daño a la salud, por la USEPA. En la figura 6.13.17 de los anexos, se presenta un cromatograma del standard de referencia con los 16 HPA`s (A) y el cromatograma con el blanco de reactivos (B), en Hexano-Diclorometano (1:1)

En las figuras de los Anexos 6.13.18 y 6.13.19 se presentan algunos ejemplos de los resultados de los cromatogramas de muestras de HPA`s obtenidas en fase gas y partícula; inyectados en el modo de monitoreo del ión SIM a una concentración entre 3500 y 4500 pg / µL;  $p < 00.1$  .

Se desarrollaron ocho diluciones corregidas por pureza: 3500-4500, 2100-2800, 1000-1400, 400-600, 200-300, 40-60, 15-22, 8-11 ng/mL. Los intervalos indican las diferentes

concentraciones de los 16 HPA's en cada dilución, las curvas se formaron con los promedios de las áreas relativas vs las concentraciones relativas de los HPA's. Con las diluciones, se calculó la pendiente de la curva de calibración (Factor de respuesta relativo) y el intercepto para cada HPA, obteniendo una línea de regresión ponderada.

Para observar los límites de detección y cuantificación, se consideró el criterio establecido por Miller y Miller (1993) donde el límite de detección (y) es la concentración del analito que da una señal igual a la del blanco (y<sub>b</sub>), más tres veces la desviación estándar del blanco (S<sub>b</sub>) y la cuantificación es 10 veces la desviación, según la siguiente ecuación:

$$Y = Y_b + 3S_b \dots \dots \dots (a)$$

Donde:

Y = Límite de detección o cuantificación en ng/ mL.

y<sub>b</sub> = señal del blanco= al valor del intercepto ponderado, en mg/ mL.

S<sub>b</sub>= Desviación estándar de la señal del blanco. Igual al valor del estadístico s(y/x) w, que se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S(y/x) w = \frac{(\sum w_i y_i^2 - n y_w^2) - b^2 (\sum w_i x_i^2 - n x_w^2)^{1/2}}{n - 2}$$

**5.2.7. Análisis e Interpretación de Resultados: Cálculos**

a) **Interpretación de los Cromatogramas:** La lectura de los HPA's en el cromatógrafo se determinaron a partir de los Tiempos de retención (TR) de cada muestra analizada y se comparó los datos de las Áreas de cada hidrocarburo y del estándar.

b) **Volùmen de la Muestra** El volumen total de la muestra debe ser corregido a presión y temperatura estándar. Para calcular el Volumen total muestreado (V<sub>m</sub>), se tomó la lectura del medidor magnelético con la hora de inicio y final del monitoreo ( 24 horas) y se determinó el flujo (Q<sub>n</sub>) con respecto a la curva de calibración del equipo.

El volumen de aire muestreado es convertido a condiciones estándar (760 mmHg y 25°C) utilizando la siguiente ecuación:

$$V_s = V_m (P_a/760) [298/(273 + T_a)] \dots\dots\dots(1)$$

Donde:

$V_s$ : volumen total muestreado ( $m^3$ ) a temperatura y presión estándar.

$V_m$ : volumen total muestreado bajo condiciones ambientales ( $m^3$ ).

$P_a$ : presión atmosférica bajo condiciones ambientales (mmHg).

$T_a$ : temperatura bajo condiciones ambientales ( $^{\circ} C$ ).

Para el cálculo de  $V_s$ , se toman las lecturas de  $P_a$  y  $T_a$  de la estación meteorológica, tomando el promedio de lecturas de la hora de inicio y final del monitoreo.

**c) Concentración de HPA's** Se calcula la concentración de cada analito de la muestra utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (ng/std } m^3) = (A_x V_t D)/(CF V_i V_s) \dots\dots\dots(2)$$

Donde:

$A_x$ : área de respuesta del compuesto medido.

$A_{is}$ : área de respuesta del estándar.

$V_i$ : Cantidad del estándar, ng/ $\mu$ l.

$V_s$ : Volumen de aire muestreado, std  $m^3$ .

$V_t$ : Volumen final del extracto.

$D$ : factor de dilución del extracto. Si el extracto no es diluido  $D$  es igual a 1. Si la muestra es diluida,  $D$  es más que 1.

$CF$ : Factor de Calibración:Es el cociente de la cantidad de masa inyectada y puede ser calculada por la concentración estándar de cada analito.

$$CF = \text{área Total del Pico/Masa inyectada (en nanogramos)} \dots\dots\dots(3)$$

### 5.3 .- Monitoreo de linfocitos de sangre periférica en población infantil.

#### 5.3.1 .- Caracterización de la población infantil de estudio

El grupo de estudio consistió en 34 niños que habitaban en 3 regiones con diferente grado de actividad petrolera. Con propósitos comparativos se formó un segundo grupo (control) de 41 niños del mismo rango de edades y condición, que habitaban en un municipio

del estado sin actividad petrolera (principal actividad de la región es agrícola y ganadera). A los participantes, previo consentimiento de los padres, se les realizó una encuesta epidemiológica, con el fin de establecer cuales son los *factores de confusión* que podrían influir en los resultados, (formato de encuesta epidemiológica en el Anexo: Apéndice “L”).

Se clasificò a los sujetos de estudio con base en la posibilidad de poder presentar los efectos más tempranos y más severos de la exposición a los agentes tóxicos ambientales involucrados como son los HPA's. Para lo cual se aplicaron los siguientes criterios:

### *Marcadores de citotoxicidad*

Debido a que el daño en el ADN está asociado con la muerte de las células, la evaluación de la citotoxicidad es un parámetro crítico en la interpretación de resultados. Por lo que se determinaron los siguientes indicadores:

- a) En relación con la cinética de proliferación celular (CPC) ; Índice Mitótico (IM) y a la proporción de la proliferación entre las primeras (M1), segundas (M2) y terceras divisiones (M3) celulares durante el cultivo. El Índice de Replicación celular (IR), relacionado con el porcentaje de replicación durante la proliferación celular entre las primeras, segundas y terceras divisiones divididas en 100) (Ivett y Tice, 1982).
- b) Frecuencia de Micronúcleos e Índice de Bloqueo de la Citocinesis (IBC) (Fenech y Morley,1985).
- c) Evaluación de la citotoxicidad mediante la determinación de la viabilidad celular de los leucocitos para el ensayo cometa, por medio de la técnica de exclusión por azul tripano, para ello se tomaron 20 µl de medio de cultivo RPMI- 1640 y 100 µl de azul tripano y 0.5 µl de sangre entera; se tomaron 10 µl de la mezcla y se colocaron en una cámara de Neubauer y se contabilizaron 100 leucocitos por individuo, diferenciando a las células vivas (apariencia refrigente) y células muertas (apariencia opaca).

### *Marcadores de Genotoxicidad*

Se tomaron como criterios de genotoxicidad a la prueba de Electroforesis Unicelular (Ensayo Cometa) y con el fin de estandarizar la técnica bajo las condiciones ambientales óptimas en el Estado de Tabasco, fue aplicado el *ensayo de reto*, por lo que fueron tomadas dos muestras de sangre periférica obtenidas del personal del laboratorio de ecotoxicología de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), las cuales fueron sometidas a una concentración de 75  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y posteriormente incubadas a diferentes tiempos (T0', T30', T60'), para permitir que el ADN dañado pudiera recuperarse.

Cada muestra contó con un tratamiento T60' al que se le agregó un químico que tiene la facultad de inhibir la reparación del ADN, la N-Hidroxiurea (NHU), esto con el propósito de comprobar si la reducción en la migración del ADN correspondía un verdadero efecto de los sistemas de reparación celular propio.

Al comparar los resultados del experimento inicial con los descritos en la literatura mundial (Anderson *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1995; Visvardis *et al.*, 1997; Horváthová *et al.*, 1998), se observó que ellos son semejantes en cuanto al comportamiento de migración del ADN, por tal motivo se consideró que el “ensayo cometa” quedaba implementando en el laboratorio y podía ser utilizado como una herramienta para el biomonitoreo de humanos expuestos a genotóxicos ambientales.

### *Criterios de inclusión.*

- a) El rango de edades de los niños era entre 5 y 15 años.
- b) Tiempo de residencia mayor de 1 año

### *Criterios de exclusión.*

- a) Antecedentes de exposición reciente y directa a plaguicidas, fertilizantes y medicamentos hormonales durante los últimos 2 meses.

- b) Infantes que se encuentran bajo tratamiento médico o que hayan recibido algún tipo de radiación (por lo menos 6 meses antes de la realización del estudio).
- c) Antecedentes heredofamiliares con alteraciones genéticas
- d) Todos los individuos que padecían una enfermedad crónica.
- e) Individuos que estuvieron expuestos a rayos "X" en el último mes antes de la toma de la muestra.

### **5.3.2. Material Biológico**

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por venopunción; el día del muestreo, durante las primeras horas del día, utilizando agujas y tubos tipo vacutainer (Becton) heparinizados y estériles (se extrajeron 5 ml de sangre a cada individuo de estudio). Los tubos fueron codificados y transportados al laboratorio, en cajas de poliuretano, a condiciones estándar de temperatura (25 ° C) de manera inmediata después de la toma de la muestra, para su posterior cultivo de linfocitos. El periodo de colecta de muestras fue del 13 de Noviembre del 2000 al 10 de Febrero de 2001.

Se tomaron 2 muestras de linfocitos de sangre periférica de individuos utilizados como controles internos positivos en el laboratorio (se adicionó al cultivo Mitomicina "C" a una concentración de  $7 \times 10^{-7}$ ) y 2 muestras de linfocitos de sangre periférica de individuos utilizados como controles negativos (individuos sanos que no habían estado expuestos a fármacos, alcohol ni tabaco).

### **5.3.3. Cultivo celular en muestras de Linfocitos de sangre periférica de la población de estudio:**

- a) Aplicación de ensayo de Micronúcleos: Bloqueo de citocinesis
- b) Aplicación de ensayo de Cinética de Proliferación Celular: CPC, IM, IR
- c) Aplicación de ensayo Cometa; Electroforesis Unicelular en microgel.

#### **5.3.4. Prueba de Micronúcleos (Fenech y Morley, 1985).**

El cultivo de las muestras de sangre periférica, para la prueba de micronúcleos se procesaron de la misma manera que la prueba de cinética de proliferación celular; se sembraron por duplicado 0.5 ml de sangre entera en tubos de 15 ml (Falcon, USA), a los que se les adicionó 6.0 ml de medio de cultivo RPMI- 1640 (Sigma, USA) suplementado con 1 % de L- glutamina (Sigma, USA) y aminoácidos no esenciales (Gibco, USA).

Los cultivos se incubaron durante 48 horas a 37° C y una vez transcurrido ese tiempo se agregó Citocalacina-B (Cyt-B, Sigma, USA) el cuál es un inhibidor de la citocinesis, se homogeneizó la muestra y se volvió a incubar a 37°C durante 24 hrs.

Después del periodo de incubación las muestras, se centrifugaron a 1200rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en una solución fijadora (metanol-ácido acético, 3:1). Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El lavado con la solución fijadora se repitió hasta que se obtuvo un botón celular limpio, al cual se le volvió agregar solución fijadora para guardarse en refrigeración a 4°C.

**a) Preparación de Laminillas** Ya obtenidos los botones se resuspendió el botón celular limpio, en 0.5ml de la solución del fijador y por goteo se tomó una porción para ser fijada en las laminillas previamente frías bañadas en alcohol y por duplicado.

**b) Tinción de Laminillas** Las laminillas una vez fijadas se tiñeron con colorante de Wright para su posterior lectura al microscopio óptico.

**c) Análisis de Laminillas** Una vez que se tienen las preparaciones de linfocitos periféricos humanos, ya procesados y colectados en laminillas, se evaluó la frecuencia de células binucleadas (CBN) con micronúcleos en 2000 células en 4 laminillas por individuo. Para determinar el daño genotóxico (Surallés y Natarajan, 1997).

Las células contabilizadas debían de presentar citoplasma intacto, con dos núcleos de tamaño similar, redondos u ovals del mismo color e intensidad.

Aplicando la fórmula

$$Fr MN = \frac{\text{Número de Micronúcleos}}{\text{Número de Células Binucleadas}}$$

Donde Número de Micronúcleos es el total de micronúcleos encontrados dividido entre el número total de células binucleadas contabilizadas en 2,000 células por individuo. Para la identificación de las células se siguieron los criterios recomendados por Montero *et al*, 1997; Surallès y Natarajan, 1997.

*Los criterios para identificar Células Binucleadas fueron:*

- ✓ Las células deberían tener 2 núcleos redondos u ovales.
- ✓ Los núcleos no debían estar conectados por puentes de cromatina.
- ✓ Los núcleos deberían estar en profase temprana.
- ✓ Los núcleos debían tener un tamaño similar (no necesariamente idéntico)
- ✓ los núcleos podían estar parcialmente sobrelapados.
- ✓ El citoplasma debía estar bien preservado.

*Los criterios para identificar Micronúcleos fueron:*

- ✓ Debían tener forma redonda u oval.
- ✓ El tamaño debía ser menor de 1/2 a 1/5 del tamaño de los núcleos.
- ✓ Los micronúcleos no debían ser refringentes.
- ✓ Debían presentar un color homogéneo o igual al de los núcleos.
- ✓ No debían tocar los bordes con ninguno de los micronúcleos.
- ✓ Debían de presentar la misma condensación que los núcleos.

Para determinar el daño citotóxico en linfocitos se evaluó el Índice de División Nuclear (IDN), para evaluar la respuesta proliferativa en un total de 2000 células en las cuales se

evaluaron, las veces que se habían dividido las células ( una vez, dos y tres veces), (Fenech, 1997; Surallès y Natarajan, 1997) y para tal fin se aplicó la fórmula:

$$IDN = \frac{NI + 2NII + 3NIII + 4NIV}{\text{Numero Total de Células}}$$

Donde el índice de División Nuclear es igual a las células mononucleadas (NI), más células binucleadas (2NII) más células trinucleadas (3 NIII ), más células tetranucleadas (4 IV) divididas entre el número total de células presentes en una laminilla.

Para evaluar el daño citotóxico se determinó el Índice de Bloqueo de la Citocinesis (IBC), con la finalidad de conocer la respuesta proliferativa de un total de 2,000 células (Pitarqué *et al*, 1996 ; Surallès y Natarajan, 1997).

$$IBC = \frac{N1 + 2NH + 3(NH1 + NIV)}{\text{Número Total de Células}}$$

Donde el índice de Bloqueo de la Citocinesis (IBC), es igual a las células mononucleadas (NI) más células binucleadas (2NII), más células trinucleadas (3 NII), más células tetranucleadas (4 IV) divididas entre el número total de células presentes en una laminilla.

### **5.3.5. Prueba de Cinética de Proliferación Celular (FPG modificada, Perry y Wolff, 1974).**

La muestra de sangre periférica de cada niño, se sembró por duplicado. Se tomaron 0.5 ml de sangre entera en tubos de 15 ml (Falcon, USA), a los que se les adicionó 6.0 ml de medio de cultivo RPMI- 1640 (Sigma, USA) suplementado con 1 % de L- glutamina (Sigma, USA) y aminoácidos no esenciales (Gibco, USA).

La proliferación de linfocitos se estimuló mediante la adición de 0.2 ml de lectina fitohemaglutinina (PHA) (Gibco, USA) y 0.3 ml del análogo de base 5-bromo-2desoxiuridina (BrDu), (Sigma, USA), para detectar a las células en fase de síntesis de ADN (inducida por el mitógeno), la cinética de proliferación y los intercambios de cromátides hermanas.

Se colocaron los tubos en una incubadora de cultivo a una temperatura de 37 °C. Se incubaron las células durante 72 horas (Moorhead *et. al.*, 1960).

Dos horas antes de cosecharse los cultivos, se agregó a éstos 0.3 ml de colcemid (Gibco, EUA) para detener la polimerización de los microtúbulos y poder evaluar el IM y la CPC, se agitaron y regresaron a la estufa de cultivo.

A las 72 horas, se centrifugaron a 1200 rpm (revoluciones por minuto). Durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de KCl (0.075M) para provocar la dispersión de los cromosomas y por 30 minutos se mantuvieron en un baño a 37°C, enseguida se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en una solución fijadora (metanol-ácido acético,3:1). Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El lavado con la solución fijadora se repitió hasta que se obtuvo un botón celular limpio, al cual se le volvió agregar solución fijadora para guardarse en refrigeración a 4°C.

a) **Preparación de Laminillas** Después de 24 horas de ser fijados, los botones celulares, se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron con 0.5ml en la misma solución fijadora.

Con una pipeta Pasteur se homogenizó la suspensión y se goteó sobre portaobjetos, previamente enfriados en alcohol, a una altura de 1.30 metros, las laminillas fueron pasadas por flama para secar la suspensión celular y por último se dejaron secando al aire.

b) **Tinción de Laminillas** Después de 24 horas, de haber sido fijadas las células en las laminillas, se sumergieron durante 30 minutos en ausencia de luz en una solución de Hoechst 33258 (1.5 ml/75 ml) en agua destilada, se enjuagaron en agua corriente y se secaron al aire.

Posteriormente, se cubrieron con buffer de fosfatos (soluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro; 66mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 66mM. pH = 6.8) y se expusieron a la luz UV durante 1:30 horas, después de lo cual, las laminillas se tñieron con una solución de Giemsa (3 ml/75 ml) en agua por 4 minutos. Se enjuagaron en agua corriente y se secaron al aire y se observaron al microscopio.

### **c) Análisis de Laminillas**

#### **ÍNDICE MITÓTICO:**

Las preparaciones se observaron con un microscopio de campo claro a 20 aumentos. Se contaron 2000 núcleos totales por laminilla, de estos se determinó cuantos se hallaron en metafase. Se leyeron 4 laminillas por donador. El valor del índice mitótico (IM) se determinó de la siguiente manera:

$$IM = \frac{\text{Número Total de Metafases}}{2000}$$

#### **CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

Se leyeron 100 metafases consecutivas por laminilla en un microscopio óptico, de las que se determinó el número de las primeras divisiones (M1), segundas divisiones (M2) y terceras divisiones (M3). Se consideraron metafases en primera división a aquellas cuyos cromosomas se encontraron completamente teñidos de oscuro; segundas divisiones a aquellas metafases en que todos sus cromosomas estaban conformados por una cromátida oscura y una clara; y en terceras divisiones a las que contuvieron metafases con los dos patrones anteriormente mencionados. Se leyeron 4 laminillas por donador.

Con los datos obtenidos se calculó el índice de replicación (IR) a partir de la siguiente ecuación ( Ivett y Tice, 1982):

$$IR = \frac{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)}{100}$$

#### **INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS**

Los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH), fueron leídos en 100 metafases totales en metafases de segundas divisiones, con  $46 \pm$  cromosomas de segundas divisiones por muestra en un microscopio óptico, con el objetivo de 100 aumentos. Se determinaron los

intercambios terminales, centroméricos e intersticiales, estos últimos con un valor del doble que los terminales, debido a que su formación requiere el doble de eventos.

#### CRITERIOS EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ICH:

- a) La metafase debe estar en segunda división.
- b) Las cromátidas de los cromosomas deben estar bien definidas y separadas.
- c) La célula debe tener al menos 44 cromosomas.
- d) Se debe analizar por lo menos 50 células por individuo.

El IM revela la proporción de núcleos que se encuentran en metafase. El IR establece la cinética de la proliferación, su valor mínimo es 1 (solo primeras divisiones) y el máximo de 3 (solo terceras divisiones), mientras que los ICH estima los rompimientos totales por cromosoma y por célula.

### **5.3.6 Prueba de Electroforesis unicelular (Ensayo Cometa)**

Con el objeto de evaluar el posible daño genotóxico en el ADN en los niños que habitan regiones con actividad petrolera, se utilizó el Ensayo de Electroforèsis Unicelular (Ensayo Cometa) en linfocitos de sangre perifèrica, según el protocolo propuesto por Singh y colaboradores en 1988.

La técnica consistió en tomarle a cada niño sangre perifèrica entera por venopunción, utilizando tubos vacutainer heparinizados.

**a) Preparación de Laminilla** Se colocaron 0.5 ml de la sangre en 2 tubos eppendoff conteniendo 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMP 0.5%, Sigma-USA) y se tomaron 75 µl y con una micropipeta se colocaron en laminillas previamente embebidas en agarosa regular al 5% (Sigma, USA) para darle soporte a las células y se les colocó un cubreobjetos, posteriormente se pusieron en charolas metálicas y se metieron al refrigerador hasta alcanzar una solidificación (por espacio de 10 minutos), al término del cual se removió el cubreobjetos

a cada laminilla y se les agregó 75  $\mu$ l más de agarosa regular y se volvieron a someter al proceso de solidificación (por espacio de 10 minutos), se les retiró el cubreobjetos y se sumergieron por espacio de 24 horas en una solución de lisis con alto contenido de detergentes y sales; para lisar las membranas celulares, así el ADN liberado fue sometido a electroforesis bajo condiciones controladas.

**b) Corrida de Electroforesis Unicelular de las Laminillas.** Las laminillas se colocaron en una Cámara de Electroforèsis, en donde se sometieron a una solución amortiguadora (NaOH, Baker) con un pH13, con el objeto de desenrollar las hebras del ADN (Unwinding), durante 20 minutos y seguidamente se expusieron durante 20 minutos, a una corriente eléctrica de 300 mA/23 v (v/cm), para poder evaluar la migración (cola del cometa), que revela el posible daño al ADN.

**c) Análisis de Laminillas** Las laminillas fueron neutralizadas con un amortiguador de pH 7.5 (Sol. Trizma 0.4 M, Sigma-USA) y fijadas en alcohol etílico. Pudieron observarse en un microscopio de fluorescencia (Olympus), equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm, utilizando un ocular de 20x de magnificación y un objetivo de 100 aumentos, en oscuridad, utilizando Bromuro de Etidio como fluorocromo. El ADN roto migra más en el campo eléctrico y las células al ser observadas asemejan a un cometa, con una cabeza altamente fluorescente y una cola que incrementa con el daño (Singh *et al.*, 1998).

Los parámetros utilizados para los criterios de evaluación, fueron los siguientes:

- ❖ Se tomaron con ayuda de un ocular con micrómetro, la longitud de 50 núcleos (cometas) por individuo en  $\mu$ m.
- ❖ Se evaluaron en un total de 100 células por muestra, la longitud de migración del ADN estimada en  $\mu$ m de cola (Tail).
- ❖ En 100 células por cada laminilla, se contó el porcentaje de núcleos y colas.

Nota: Se tomaron como referencia lecturas de controles internos del laboratorio, que fueron utilizados en cada corrida de electroforesis, con duplicado cada uno, para asegurar las condiciones estándar de cada corrida.

El daño genotóxico, evaluado como migración del ADN (Longitud de Cola) fue medido en micras, con un pH de 13, así como en unidades de longitud del núcleo (Cola/Cabeza) en 50 células de cada individuo. Se cuantificaron células con incrementos en la frecuencia de rompimientos de la doble cadena que se manifestaron en una mayor migración del ADN nuclear hacia el ánodo, con marcador fluorescente.

Cada célula dañada tenía la apariencia de un cometa con una cabeza altamente fluorescente y una cola con longitud e intensidad de fluorescencia relacionada con el número de rompimientos inducidos por los agentes genotóxicos (Rojas, 1999)

**d) Determinación de Viabilidad** Para determinar el grado de daño genotóxico que presentó el ADN en los grupos estudiados, los núcleos observados fueron asignados en tres categorías, de acuerdo al valor del radio “r” del núcleo. Donde  $r = \text{medida de la cola} / \text{medida de la cabeza}$ . Cuando “r” era  $\leq 1$ , los núcleos se consideraban con bajo grado de daño, si “r”  $\leq 2$  el daño era medio y alto grado de daño cuando “r” era  $> 2$ . En esta última clase se incluyeron aquellos núcleos en los cuales virtualmente todo el ADN migró fuera de la región de la cabeza del cometa (Morley, N., 2006).

#### **5.4 .- Medición de los parámetros Meteorológicos en los sitios de estudio: Condiciones de velocidad y dirección del viento (Rosas de viento), precipitación pluvial, período de muestreo.**

La concentración de los contaminantes en la atmósfera, va a estar influenciada por las condiciones meteorológicas del lugar, por lo cual es necesario considerar en el estudio el efecto que puedan ejercer en el comportamiento de los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos. Por lo que se registraron los datos de: Temperatura ambiente, Humedad Relativa, Velocidad y Dirección del viento y Precipitación pluvial de manera continua por medio de una estación meteorológica portátil (Davis, Modelo, Weather Monitor II). Los registros se realizaron en las épocas de Otoño-Invierno, durante periodos de 15 ó 30 minutos y los resultados de los datos meteorológicos registrados durante 24 horas de muestreo se promediaron para cada variable y se realizaron rosas de viento para cada sitio de monitoreo. Se presenta el esquema del equipo en el Anexo; Figura. 5.1.A.4 .y la Tabla 4.7 con las condiciones meteorológicas de cada sitio durante los días de monitoreo.

## 5.5.- Análisis Estadístico de las relaciones entre las concentraciones de HPA's y las variables poblacionales

La interpretación estadística se analizó con base en las diferencias entre el grado de daño al ADN de la batería de biomarcadores aplicada a la población de estudio expuesta a algún proceso petrolero y al grupo control, en relación con los valores de HPA's registrados en diferentes sitios del estado de Tabasco, para lo cual se realizó una inferencia estadística no paramétrica para evaluar dicha correlación; análisis bivariado y multivariado de los resultados obtenidos.

El análisis estadístico, se desarrolló con el programa *Stata Ver. 6*, aplicando una comparación entre los niños expuestos y no expuestos de acuerdo a la variables de exposición; definida por el lugar de residencia y para el caso de las variables categóricas, se aplicaron las *pruebas de  $\chi^2$  de Pearson y/o la exacta de Fisher* (esta última se utilizó cuando se obtuvo un número menor a cinco en alguna de las celdas de la tabla de esperados), de acuerdo a los supuestos de cada una. En el caso de las variables continuas, se utilizó la *prueba de "t" de Student* para evaluar la diferencia de medias cuando se cumplieron los supuestos de la prueba. En caso contrario se utilizó la *prueba de la suma de rangos de Wilcoxon o Mann Whitney*, para la interpretación del análisis descriptivo de los parámetros poblacionales. En todos los casos se tomó como estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio para identificar si existían valores fuera de rango en la base de datos y se corroboró si eran correctos de acuerdo a la fuente original. La variable de interés o respuesta fueron los diferentes biomarcadores de daño temprano (Cinética de proliferación Celular, Prueba de Micronúcleos y Ensayo Cometa), cuya escala de medición original fue continua; se consideraron como variables de exposición principal a los diferentes hidrocarburos (los 16 HPA's considerados como prioritarios desde el punto de vista de afectación a la salud) de manera individual y su concentración total, la escala de medición de estos también fue continua. El resto de las covariables incluyeron variables continuas y categóricas, algunas de ellas fueron recodificadas como variables dicotómicas.

Para comprobar la hipótesis de igualdad entre las medianas de los grupos de estudio y los datos de HPA's se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Considerando

valores de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos. Para la distribución de la migración del ADN de los niños biomonitoreados se aplicó la prueba de chi cuadrada.

La descripción de las variables categóricas se desarrollaron como frecuencias y porcentajes, para las continuas se emplearon medidas de tendencia central (media, mediana) y dispersión (rango, desviación estándar y percentiles 10 y 90).

Para evaluar la asociación entre los diferentes hidrocarburos y otras variables de exposición con los diferentes biomarcadores se utilizó la regresión lineal simple y múltiple cuando el biomarcador se manejó de manera continua y para la construcción de los modelos múltiples se incluyeron las variables que tuvieran relevancia desde el punto de vista biológico (16 hidrocarburos reportados como dañinos a la salud) así como las que tuvieran un valor  $p < 0.05$  en los análisis previos.

Posteriormente se evaluaron las variables confusoras y su interacción, mediante las pruebas de significancia y la influencia ejercida sobre las variables dependientes del estudio; después se realizó el diagnóstico del modelo más adecuado a través de un análisis de residuales y estadísticas de influencia.

En el caso de los micronúcleos por célula, la longitud de la cola y la razón cola/cabeza, con su escala original no se cumplieron los supuestos de la regresión lineal por lo que se construyeron los modelos con el logaritmo natural de esos biomarcadores. Para el resto de los modelos se utilizaron los biomarcadores en su escala original.

Finalmente se hizo análisis de regresión logística simple y múltiple para la variable razón cola/cabeza dicotómica con un punto de corte  $\geq 20$ ; para la construcción del modelo múltiple se incluyeron las variables que tuvieran relevancia desde el punto de vista biológico así como las que tuvieran un valor  $p < 0.05$  en los análisis previos, se evaluaron las posibles interacciones y potenciales confusores; se hizo el diagnóstico del modelo a través de pruebas globales de bondad de ajuste y diferentes estadísticas de influencia.

## **6 .- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

### **6.1 .- Grupo de Estudio**

La población de estudio estuvo conformada por 75 niños, provenientes de 6 zonas del Estado de Tabasco (población expuesta; con exposición a HPA's y población control; sin exposición a HPA's); seleccionadas en base en características de casos y controles. La población infantil del estudio, tenía edades promedio de 10 años, en ambos sexos. La aplicación de una encuesta epidemiológica, permitió establecer los parámetros personales así como los estilos de vida de los niños involucrados en el estudio, incluyendo posibles exposiciones medicamentosas, a insecticidas y al humo de leña, utilizada para cocinar, así como a antecedentes heredofamiliares. (Anexo: Apéndice "L").

Con el objeto de evaluar el posible daño al ADN en los habitantes de las regiones en estudio, se aplicó una batería de biomarcadores de daño temprano (Ensayo Cometa, Cinética de Proliferación Celular y Micronúcleos) en linfocitos de sangre periférica de seis grupos de niños en edades entre 6 y 15 años, que vivían en regiones con diferente grado de actividad petrolera. Con propósitos comparativos se formó un segundo grupo (testigo) con un total de 41 niños con el mismo rango de edades y condición social, pero que habitaban en un municipio del estado sin actividad petrolera.

Para la descripción de las variables categóricas se calcularon frecuencias y porcentajes. Para las variables continuas se emplearon medidas de tendencia central (media, mediana) y dispersión (rango, desviación estándar y percentiles 10 y 90).

Las Tablas No. 6.1.1 a la 6.4 describen a la población de estudio y la relación entre los individuos expuestos y no expuestos a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en la Atmósfera de las regiones estudiadas.

En la Tabla 6.1.1, se observa que la población expuesta y no expuesta presentaron características generalmente homogéneas; sin embargo se encontraron diferencias estadísticas

significativas menores a  $p \leq 0.05$  en la variable; tipo de población (rural y urbana). Lo cual define a la población estudiada principalmente como rural.

**TABLA 6.1.1.- Comparación de algunas variables antropométricas entre sujetos expuestos y no expuestos a diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos(HPA's).**

Variable	Expuestos (n=34)		No expuestos (n=41)		Valor p
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
<b>Género (sexo)</b>					
Hombres	20	58.82	25	60.98	0.8*
Mujeres	14	41.18	16	39.02	
<b>Tipo de población (poblacio_rec)</b>					
Rural	34	100	32	78.1	0.004**
Urbana	0	0	9	21.9	
<b>Sitio (sitio)</b>					
San Miguel	10	29.4			-
G. Méndez	12	35.3			
Torno Largo	12	35.3			
Netzahualcoyotl			15	36.6	
Uquiná			17	41.5	
Villahermosa			9	22.9	
<b>Tiempo de residencia (media, d.e.) (t_resid)</b>	9.59 (2.99)		9.76 (3.90)		0.8***
<b>El agua proviene de: (agua_dic)</b>					
pozo/río	10	29.4	19	46.3	0.1
llave/garrafón	24	70.6	22	53.7	
<b>Tipo de estufa (estufa_rec)</b>					
leña/gas	27	79.4	31	75.6	0.7*
Gas	7	20.6	10	24.4	
<b>La estufa está dentro de la casa (dentr_f2rec)</b>					
Sí	13	38.2	18	43.9	0.6*
No	21	61.8	23	56.1	

\*Chi<sup>2</sup> de Pearson.

\*\*Prueba exacta de Fisher.

\*\*\*t de student.

La Tabla 6.2 resume algunas características antropométricas y clínicas entre los niños expuestos y no expuestos de acuerdo a la encuesta aplicada. En donde no se observan diferencias significativas entre los grupos ( $p \leq 0.05$ ). Mostrando ambas poblaciones características homogéneas en promedio.

**TABLA 6.2. Características Antropométricas, Clínicas y Antecedentes Familiares.**

Variable	Expuestos (n=34)		No expuestos (n=41)		valor p p< 0.05
	media	d.e.	media	d.e.	
<b>Edad (edad)</b>	10.52	2.33	11.05	2.84	0.4*
<b>Peso en kilogramos (peso)</b>	32.66	13.29	36.99	14.45	0.2*
<b>Talla en metros (talla)</b>	1.29	0.22	1.38	0.18	0.07*
<b>Índice de masa corporal (imc)</b>	10.53	2.32	11.05	2.83	0.4*
Variable	Antecedentes personales, familiares patológicos y no patológicos				valor p p< 0.05
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
<b>Alguna enfermedad viral (enf1_viral)</b>					
Sí	8	24.2	13	31.7	0.5**
No	25	75.8	28	68.3	
<b>Ha recibido alguna vacuna en los últimos seis meses (vacunas_rec)</b>					
Sí	3	8.8	4	9.8	1**
No	31	91.2	37	90.2	
<b>Hipertensión arterial (pres_alt; padres)</b>					
Sí	24	70.6	26	63.4	0.5**
No	10	29.4	15	36.6	
<b>Diabetes (diabetes)</b>					
Sí	14	41.2	24	58.5	0.1**
No	20	58.8	17	41.5	
<b>Cáncer (cancer)</b>					
Sí	12	35.3	9	21.9	0.2**
No	22	64.7	32	78.1	
<b>Malformaciones (malform)</b>					
Sí	6	17.7	6	14.6	0.7**
No	28	82.3	35	85.4	
<b>Fuma el padre (fuma_pad)</b>					
Sí	7	20.6	10	24.4	0.7**
No	27	79.4	31	75.6	

Fuma la madre (fuma_mad)					
Sí	1	2.9	1	2.4	0.7***
No	33	97.1	40	97.6	

\*T de student.

\*\*Chi<sup>2</sup> de Pearson.

\*\*\*Prueba exacta de Fisher.

La Tabla 6.3 describe la relación por exposición de la población de estudio a plaguicidas en el hogar y ambos grupos de estudio mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). El porcentaje más alto, lo presento el grupo considerado como expuesto. La frecuencia registrada en el uso de plaguicidas en ambos grupos, muestra que la población infantil, independientemente de la exposición a hidrocarburos se encuentra en contacto frecuente con insecticidas en el hogar. La condición de la distancia donde habitan los niños con respecto a campos agrícolas, mostraron diferencias significativas y según los datos arrojados en la encuesta, no es un factor de riesgo que incida en el grupo de la población no expuesta a hidrocarburos policíclicos aromáticos, a diferentes distancias de los campos agrícolas:

**TABLA 6.3. Uso de plaguicidas e insecticidas entre niños expuestos y no expuestos a hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's).**

Variable	Expuestos (n=34)		No expuestos (n=41)		valor $p \leq 0.05$
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
<b>Uso de insecticidas (insectim_rec)</b>					
Sí	33	97.1	33	80.5	0.04**
No	1	2.9	8	19.5	
<b>Intensidad del uso de insecticidas</b>					
no detectable (intens__)	29	85.3	24	58.5	0.06**
leve (<1 vez por semana)	3	8.8	7	17.1	
moderado (2 a 3 veces/semana)	2	5.9	7	17.1	
severo (diario)	0	0	3	7.3	
<b>Usa plaguicidas el padre (plag_pad)</b>					
Sí	10	29.41	19	46.34	0.1*
No	24	70.59	22	53.66	

<b>Usa plaguicidas la madre(plag_mad)</b>					
Sí	13	38.2	13	31.7	0.5*
No	21	61.8	28	68.3	
<b>Uso de plaguicidas dentro de la casa (dentro_c)</b>					
Sí	2	5.9	6	14.6	0.3**
No	32	94.1	35	85.4	
<b>Usa plaguicidas el niño (maneja_prec)</b>					
Sí	3	8.8	7	17.1	0.3**
No	31	91.2	34	82.9	
<b>Uso de plaguicidas por el niño en los últimos 6 meses (últimos_)</b>					
Sí	3	8.8	4	9.8	1**
No	31	91.2	37	90.2	
<b>Frecuencia de uso de plaguicidas por el niño en los últimos 6 meses (veces__arec2)</b>					
Ninguna	31	91.2	37	90.2	0.5**
1 a 3 veces	3	8.8	2	4.9	
6 a 12 veces	0	0	2	4.9	
<b>Hace labores agrícolas el niño (labores_rec)</b>					
Sí	8	23.5	8	19.5	0.7*
No	26	76.5	33	80.5	
<b>Frecuencia con que el niño participa en labores agrícolas (frecuen1_rec)</b>					
Ninguna	26	76.5	33	80.5	0.7**
1 a 3 veces a la semana	3	8.8	5	12.2	
4 a 7 veces a la semana	5	17.7	3	7.3	
<b>Vive cerca de un campo agrícola (vive_agr)</b>					
Sí	7	20.6	0	0	0.003**
No	27	79.4	41	100	
<b>Distancia del campo agrícola (dist_m_)</b>					
No cercano	27	79.4	41	100	0.003**
20 metros	4	11.8	0	0	
50 metros	2	5.9	0	0	
2000 metros	1	2.9	0	0	

\*Chi<sup>2</sup> de Pearson.

\*\*Prueba exacta de Fisher.

## 6.2 .- Medición de los Parámetros Meteorológicos en los sitios de estudio.

La naturaleza química de los HPA's puede ser afectada por las condiciones meteorológicas del lugar y los procesos de fotodegradación que ocurren durante el muestreo, por lo que es necesario considerar el efecto de los factores tales como humedad relativa, precipitación, temperatura, velocidad y dirección del viento.

En la caracterización de los puntos de monitoreo, se observó que los sitios donde habita la población de estudio, tienen predominantemente condiciones superficiales planas y de gran extensión, lo cuál facilita la rápida dispersión de los contaminantes atmosféricos (Baird, 2001).

La presencia de lomeríos en las poblaciones de Netzahualcóyotl, Uquiná y la Loma y San Miguel Ira. Sección no forman una barrera natural que evite la dispersión de los hidrocarburos o algún otro compuesto volátil, ya que la altura y presencia de este tipo de topografía es limitada.

Los datos meteorológicos se registraron cada 15 ó 30 minutos durante las 24 Hrs durante los períodos de monitoreo, según se muestran en la siguiente Tabla. Los datos meteorológicos completos así como las muestras de los 6 sitios de monitoreo se presentan en la Tabla 4.7 del Anexo.

**Tabla No. 6.4. Periodo de Monitoreo de datos Meteorológicos.**

SITIO DE MUESTREO	PERIODO
Netzahualcóyotl y Uquiná, Balancán*	Noviembre 2000 (7 días)
Gregorio Méndez 1ª. Secc., Comalcalco	Noviembre 2000 (7 días)
Nuevo Torno Largo, Paraíso	Diciembre 2000/Enero 2001 (7 días)
San Miguel 1ª. Secc. Reforma	Abril 2001 (7 días)
Col. Las Gaviotas, Villahermosa	Febrero 2001 (7 días)

\*Los datos de monitoreo Netzahualcóyotl y Uquiná, Balancán fueron representados en uno, debido a la cercanía entre ambos.

Los factores meteorológicos se determinaron a partir de una Estación Meteorológica Automatizada marca Davis Instrument la cual contaba con un Data Logger (Dispositivo de almacenamiento de datos) en donde se almacenaron los datos de temperatura, humedad relativa, presión atmosférica, precipitación, velocidad y dirección del viento. Posteriormente la Información era vaciada a una computadora; procesada y analizada mediante un software especializado (PCLink). (Anexo; Figura 5.1.A.4)

#### **a) Velocidad y dirección del viento**

Las comunidades de Netzahualcóyotl y Uquiná, en el Municipio de Balancan, presentaron vientos predominantes del SSE y E (15 y 16%) con velocidades del viento de 1.7 y 2.3 m/s, con un 28% de calmas. En la literatura se tienen registros de valores máximos de velocidad de viento en los meses de noviembre con velocidades que alcanzan los 30 Km/h (Atlas del Clima del Estado de Tabasco, 2001)

Estas comunidades son rurales y su principal actividad es la agropecuaria. Las principales fuentes de emisión son quema de residuos sólidos y forestales, además de que culturalmente se acostumbra cocinar los alimentos con leña ò carbón, lo que constituye la fuente de emisión más importante de HPA`s).

En la población de Gregorio Méndez, se registraron vientos dominantes del NNE y del NE (8 y 21%) con una velocidad máxima de 1.8 m/s y del N (11%) con velocidades de 1.5 m/s y un 48% de calmas. Los vientos dominantes en el sitio G. Méndez, tuvieron una dirección Noreste (NE) y una velocidad de viento baja (48% de calmas), esto ocasiona una dilución atmosférica baja en la concentración de HPA`s provenientes de las quemas forestales, la quema de residuos sólidos y las emisiones del parque vehicular del municipio de Comalcalco y Paraíso. (Ver Apéndice "K": Rosas de vientos de cada sitio de estudio).

Se tienen registros en la literatura sobre las máximas velocidades del viento en los meses de noviembre y diciembre con valores que alcanzan los 30 km/h presentando en junio las menores velocidades (18km/h); (Atlas del Clima del Estado de Tabasco, 2001).

Los vientos dominantes de la población de Nuevo Torno Largo, en el período de monitoreo fueron predominantemente del E, N y ENE, con 17% el primero y 15% de

frecuencia los dos últimos, con velocidades del viento de 8.0, 11.0 y 6.0 m/s respectivamente. Y un 2 % de calmas.

Las velocidades máximas de vientos que se concentran en los meses de octubre, noviembre y diciembre, que alcanzan los 30 k/h., presentándose en mayo y junio las menores, con velocidad de 21 km. por hora. (Atlas del Clima del Estado de Tabasco, 2001)

Los vientos dominantes de la población de San Miguel 1ª. Secc., para el período de monitoreo fueron; S (19 %), SSW, SW, SSE y SE (10%) con velocidades de viento de 1.7 m/s, 2.0, 1.8 y 1.6 m/s respectivamente. La dirección del viento influyó en la dispersión de los HPA's provenientes del Complejo Procesador de Gas Cactus (PEMEX), (Anuario estadístico del Estado de Chiapas, 2001).

En la colonia Las Gaviotas en la Ciudad de Villahermosa, se registraron vientos dominantes del NNW con una frecuencia del 19% y una velocidad promedio de 2.6 m/s, influenciando la concentración de HPA's, registrada en el estudio proveniente del Parque vehicular, asaderos de alimentos, panaderías y tortillerías de la Ciudad. La literatura tiene registros de las velocidades de vientos de los meses de octubre y noviembre, en donde las máximas velocidades de viento fueron de 30 km/h .

Según la escala de Beaufort, la velocidad de los vientos en los sitios de estudio, no generò efectos con causas catastróficas, tan solo representan pequeñas ventolinas o frescos. Las corrientes de aire con mayor velocidad se registraron en la población de Torno Largo, esto se debe a que se encuentra ubicada en una zona cercana a la costa por lo que los vientos provenientes del mar influyen notablemente en el transporte y dispersión de los contaminantes atmosféricos generados en la Terminal Marítima de Dos Bocas (Guzmán, 1998). (Ver Apéndice "K": Rosas de vientos de las zonas de estudio en los anexos).

Wania y colaboradores, (1998) han discutido la relación entre temperatura y concentración descrita por las gráficas de Clausius Clapeyron no encontrando una relación definida entre ellas. Sin embargo estos autores reportan que el incremento en la velocidad del viento produce un descenso en la concentración de los HPA's y que la advección desde

fuentes de área o de regiones más limpias, llegan a ser la condición ambiental dominante en un sitio determinado.

### b) Temperatura

La temperatura más alta promedio se registrò en la comunidad de San Miguel (27.01°C) y la menor en la población de Nuevo Torno Largo (22.5°C). En la siguiente tabla se presentan los datos:

**Tabla 6.5. Temperatura promedio en el período de monitoreo**

SITIO DE MUESTREO	TEMPERATURA (°C)
Netzahualcòyotl y Uquiná, Balancán*	26.9
Gregorio Méndez 1ª. Secc., Comalcalco	23.3
Nuevo Torno Largo, Paraíso	22.5
San Miguel 1ª. Secc. Reforma	27.01
Col. Las Gaviotas, Villahermosa	23.50

\*Los datos de monitoreo Netzahualcòyotl y Uquiná, Balancán fueron representados en uno, debido a la cercanía entre ambos.

Las condiciones de Temperatura y Presión Atmosférica se comportan de forma similar en las 5 poblaciones, por lo que la influencia de estos parámetros sobre las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos en la atmósfera, se podrían considerar con pocas variaciones. Tanto la temperatura como la presión atmosférica predominante en los sitios de monitoreo permiten una fácil volatilización de los hidrocarburos, de acuerdo a las propiedades físico-químicas de los HPA's (EPA 1997; Awata et al., 1998).

El municipio es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano, tiene una temperatura media anual de 26.4°C, la máxima media mensual en mayo de 30.5°C, y la mínima media en diciembre y enero de 22°C.

### c) Precipitación y Humedad Relativa

En el periodo de muestreo, la precipitación promedio mayor se registró en la Colonia Las Gaviotas, Villahermosa, Tabasco (115 mm), en las comunidades de Gregorio Méndez y Nuevo Torno Largo, los eventos de lluvia fueron menores registrando precipitaciones de 19.8

mm y 21.0 mm respectivamente, mientras que la comunidad de Netzahualcóyotl registro muy poca precipitación (1.3 mm.). Mientras que el sitio San Miguel no presentó evento de lluvia.

Los porcentajes mayores registrados de Humedad Relativa (% H.R.) se presentaron en la comunidad de Gregorio Méndez (81.45 %) y en la Colonia las Gaviotas (80.22%) y los sitios con menor porcentaje de H.R. fueron las comunidades de Netzahualcóyotl, Uquiná y San Miguel (71.11%) y el sitio Nuevo Torno Largo no registró datos.

Existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de HPA's registrados en cada sitio de muestreo con los eventos de precipitación que se registraron durante el periodo de muestreo, ya que a mayor precipitación hay un lavado en la atmósfera, lo que favorece la disociación de compuestos químicos, disminuyendo su concentración en el aire.

El comportamiento de los HPA's en ambientes con altos porcentajes de Humedad Relativa tienen una relación directa con el tamaño de partícula y el peso molecular del compuesto al que se incorpora, es decir hidrocarburos con alto peso molecular son absorbidos por aerosoles muy finos y los HPA's más volátiles o de menor peso molecular se asocian con las partículas más grandes, debido a su capacidad hidrofóbica; por lo que los HPA's se estimaron en función de la medida de distribución de cada uno de los hidrocarburos que es suficientemente removido. Las distribuciones por tamaño de los HPA's, cambian en dirección viento abajo de las fuentes de emisión debido a la depositación selectiva de los aerosoles más grandes durante el transporte atmosférico (Offenberg y Baker, 1999).

Los HPA's cuando están presentes en el aire se encuentran como vapores o adheridos a las superficies de pequeñas partículas sólidas, pudiendo viajar a largas distancias antes de regresar a la tierra con el agua de la lluvia o depositarse como partículas. (Chunlong *et al.*, 2003)

La presencia de precipitación en sitios con HPA's presentes en la atmósfera, permite el arrastre de tales compuestos, generando una mayor disponibilidad de los hidrocarburos y depositarse en agua, suelos, sedimentos y alimentos.

### 6.3 Concentración de HPA's por sitio de monitoreo

Para el muestreo de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en la atmósfera, se tomaron 7 muestras durante 24 horas en cada sitio de monitoreo. En el Anexo de la Tabla 6.3.A, se presenta el número de muestras por sitio y las condiciones de operación del equipo durante cada día de monitoreo. Utilizando la metodología establecida por la EPA-TO<sub>13</sub> (1997).

Cada sitio de muestreo presentó un valor de HPA's en fase gaseosa y otro en fase partícula. A cada muestra se le determinaron los siguientes 16 hidrocarburos establecidos como prioritarios en la técnica EPA-TO-13: acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno (1,2,3-c,d), pireno, benzo(g,h,i)perileno y dibenzo(a,h)antraceno. La concentración total de Hidrocarburos Policíclicos en cada sitio de muestreo (HPA's totales) se define como la suma de las concentraciones de los 16 HPA's durante el período de muestreo (Noviembre a Enero).

En la tabla 6.6. se presentan las concentraciones promedio de los hidrocarburos totales (HPA's), en Fase Gas y Fase Partícula y la suma de ambas fases de todos los sitios de monitoreo. Se observa que las concentraciones de HPA's totales en la fase gaseosa fueron más altas que en fase partícula. Esto es importante para la salud humana debido a que en el estado gaseoso, estos compuestos pueden ser transportados hacia zonas profundas del tracto respiratorio, y luego ser atrapados en los pulmones (Mei *et al.*, 2008).

La distribución de los HPA's en ambas fases en la atmósfera es determinada por la presión del vapor de los compuestos así como por la presión atmosférica y la temperatura. La presión del vapor para los compuestos volátiles se ubica entre  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$  torr, estableciendo una distribución de éstos compuestos mayormente en la fase gaseosa para las condiciones de campo imperantes en el área de muestreo. Por otro lado, los HPA's con pesos moleculares elevados permanecen en estado líquido, asociados a las partículas debido a sus presiones de vapor menores.

En relación a la variabilidad de las concentraciones totales de HPA's en fase gas y partícula en la atmósfera registradas en el estudio, es debida a la falta de constancia de los

parámetros meteorológicos. Diferentes autores reportan, que las concentraciones de los hidrocarburos fluctúan día a día, reflejando diferentes orígenes de las masas de aire y por la contribución de diferentes fuentes de emisión, además de que algunos HPA's son totalmente reactivos y se combinan con las variaciones de temperatura y otros factores meteorológicos (Gigliotti, 2000). Por lo que es necesario realizar monitoreos continuos de hidrocarburos en el aire por lo menos durante todo el año, para determinar variaciones estacionales.

**TABLA 6.6. Distribución de las concentraciones totales del HPA's (ng m<sup>-3</sup>) entre los componentes gaseosos y particulado de dos regiones (población expuesta y población no expuesta) en el estado de Tabasco con diferente actividad:**

Todos los sitios (n=22)	media (d.e.)	Mediana	valor mínimo	valor máximo	
Fase gas	143.79 (35.98)	144.17 (91.16, 202.2)	91.16	202.2	
Fase partícula	56.39 (37.86)	66.01 (19.97, 132.95)	19.97	132.95	
Total	200.17 (42.92)	164.14 (162.51, 273.67)	162.51	273.67	
COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE HIDROCARBUROS ENTRE REGION CON ACTIVIDAD PETROLERA Y REGION SIN ACTIVIDAD PETROLERA					
	Región con activ. petrolera (n = 12)		Región sin activ. petrolera (n = 10)		valor p**
	media (d.e.)	mediana*	media (d.e.)	mediana*	
Fase gas	156.43 (45.61)	165.06 (94.16, 202.20)	133.29 (20.76)	144.17 (94.64, 144.17)	0.001
Fase partícula	87.63 (29.79)	71.47 (66.01, 132.95)	30.48 (20.07)	19.97 (19.97, 67.87)	<0.001
Total	244.06 (22.39)	231.07 (224.11, 263.67)	163.78 (0.68)	164.14 (162.51, 164.14)	<0.001

\*Mediana y percentiles 10 y 90. \*\*Prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney); corresponde a la comparación de medianas

Comparando los resultados de las concentraciones de HPA's, registradas entre los grupos expuestos y no expuestos, se observa que las concentraciones más altas se presentaron en los sitios considerados como expuestos, mostrando valores significativos ( $p \leq 0.001$ ), con una concentración mayor, tanto en la fase gas como en la fase partícula.

En la Tabla No. 6.7 se muestra la distribución de las concentraciones totales del HPA's ( $\text{ng m}^{-3}$ ) entre los componentes gaseoso y particulado de dos regiones en el estado con y sin actividad petrolera de un total de 35 muestras (por triplicado). El valor de "n" representa el número de muestras mientras que el valor de "p" representa su probabilidad. Los números en paréntesis son la desviación estándar (d.e.) para los promedios y los percentiles 10 y 90 para las medianas.

Las concentraciones de HPA's de zonas petroleras presentaron valores más altos con respecto a los valores de las zonas no petroleras, lo cual se manifiesta en los valores medios de las sumatorias. A pesar de ello, sólo la concentración de HPA's asociada al medio particulado de la región con actividad petrolera muestra diferencias significativas con respecto a la zona de actividad no petrolera ( $p < 0.05$ ). La concentración de HPA's del medio gaseoso fue más alta en la región de actividad del petróleo, pero no diferente estadísticamente.

Se establece una comparación de la concentración de hidrocarburos (HPA's) en diferentes grupos, desde el punto de vista de los compuestos que presentan un riesgo a la salud:

**TABLA No. 6.7. Concentraciones de algunos HPA's encontrados en las regiones de estudio con y sin actividad petrolera.**

HPA's de riesgo a la salud ( $\text{ng m}^{-3}$ )	Región Productora de Petróleo ( $n = 21$ )		Región no productora de petróleo ( $n = 14$ )		Valor p**
	media (d.e.)	mediana*	media (d.e.)	mediana*	
Riesgos a la salud	$\text{ng m}^{-3}$		$\text{ng m}^{-3}$		
Total (22 muestras)	215.65 (25.63)	207.5 (189.5, 248.45)	125.19 (10.42)	119.73 (119.73, 144.59)	<0.001

Benzo(a)Antraceno†	37.06 (10.14)	35.88 (25.69, 49.4)	12.27 (7.62)	8.28 (8.28, 26.46)	<0.001
Criseno†	39.16 (20.42)	52.89 (11.94, 54.94)	6.97 (5.36)	4.16 (4.16, 16.97)	<0.001
Benzo(b)Fluoranteno	14.18 (10.64)	12.08 (1.21, 27.09)	13.92 (1.85)	12.96 (12.96, 17.37)	0.02
Benzo(k)Fluoranteno	42.17 (8.80)	43.26 (31.43, 52.0)	20.2 (2.02)	21.26 (16.44, 21.26)	<0.001
Benzo(a)Pireno†	18.8 (5.06)	15.31 (14.9, 25.54)	11.99 (2.02)	10.94 (10.94, 15.75)	<0.001
Indeno(1,2,3-c,d)Pireno	46.67 (16.87)	42.25 (26.88, 67.57)	56.69 (10.39)	62.13 (37.33, 62.13)	0.3
Dibenzo(a,h)Antraceno	17.62 (9.76)	12.24 (10.62, 32.48)	3.13 (5.98)	0 (0, 14.27)	<0.001
Origen pirogénico					
Total(13 muestras)	113.49 (31.31)	111.71 (77.55, 150.92)	56.71 (8.46)	52.28 (52.28, 72.48)	<0.001
Fenantreno	2.15 (0.95)	1.74 (1.17, 3.38)	3.53 (0.84)	3.09 (3.09, 5.09)	0.0005
Fluoranteno	10.13 (5.14)	12.74 (2.32, 14.02)	15.84 (6.05)	19.01 (4.57, 19.01)	<0.001
Pireno	6.2 (1.74)	5.28 (4.55, 8.49)	6.11 (1.32)	6.8 (3.64, 6.08)	0.9

\*Mediana y percentiles 10 y 90. \*\*Prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney); "p" corresponde a la comparación de medianas. † grupo de origen pirogénico. \*\*\*acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, naftaleno, Benzo (e) pireno no se detectaron.

Los 16 HPA's estudiados, son de interés desde el punto de vista de contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) debido a su actividad genotóxica, mutagénica o carcinogénica (IARC, 1987; USEPA, 1999; ATSDR, 1996). La selección de estos compuestos se basa en varios factores como son: toxicidad, facilidad de obtener información acerca de ellos, exposición humana a estos compuestos a lo largo de la historia y su frecuente aparición en sitios contaminados. Los efectos sobre la salud

humana dependen de la dosis, tipo y ruta de exposición así como de las características particulares de cada individuo expuesto.

El estudio refleja valores consistentemente más elevados para cada uno de los HPA's en la atmósfera de la región con alta actividad de producción del petróleo. No obstante, estas diferencias no fueron todas significativas. Algunos autores han propuesto que el tipo de Hidrocarburo en la atmósfera tiene una relación directa con las fuentes de emisión y la cantidad de HPA's que se genera en cada proceso, dependerá del material y la tecnología de combustión bajo condiciones predeterminadas lo que produce una cantidad específica e invariable de HPA's; por ejemplo, se han reportado en la literatura compuestos específicos para determinadas fuentes que inclusive, se han utilizado como huellas digitales. Varios autores han calculado factores de emisión de HPA's a partir de investigaciones que se han realizado sobre la emisión en diferentes procesos (Bjorseth y Ramdahl, 1985; Wild y Jones 1995). En la Tabla 6.8 se muestran algunos ejemplos de cantidades emitidas reportadas para diferentes fuentes de emisión.

**Tabla No. 6.8. Concentraciones típicas de HPA's en diferentes fuentes.**

Fuente de emisión	Combustible	Concentración promedio	HPA's predominantes
Vehículos <sup>1</sup>	Gasolina sin plomo	Vapor - 221 gkm <sup>-1</sup> Partículas-30.7 gkm <sup>-1</sup>	Flu, Phe. BaA, BaP
Generación de energía <sup>1</sup>	Carbón Petróleo	41.9 gkg <sup>-1</sup> 157 gkg <sup>-1</sup>	Pyr, Phe Phe
Cocción de alimentos <sup>1 y 2</sup>	Madera	355 gg <sup>-1</sup> 1 - 370 gg <sup>-1</sup>	Pyr, BaA, Cry
Incineración	<sup>1</sup> Residuos <sup>2</sup> Neumáticos	3.9 gm <sup>-3</sup> 240 gg <sup>-1</sup>	Flu, Pyr, BaA
Quema agrícola <sup>1</sup>	Pastizal	352 gg <sup>-1</sup>	Pyr, BaA, Cry
Colillas de cigarro <sup>3</sup>	Tabaco	264 - 746 ngg <sup>-1</sup>	Flu y Pyr

1) Wild y Jones, 1995; 2) Bjorseth y Ramdahl, 1985; 3) Díaz *et al.*, 2001.

Algunas relaciones de HPA's se han definido como específicas para separar la combustión general y combustibles del petróleo, en zonas rurales y urbanas; así como para diferenciar la vegetación quemada con los diferentes tipos de combustibles aplicado a zonas

tropicales. En las distintas asociaciones existe también una gran variedad de valores por distintos autores para describir una fuente de origen, como es el caso del BaA/BaA+Cry y Bghi/Ind propuesta por Bucheli *et al.* (2004), Schulz y Emeis (2000) entre otros.

En la Tabla 6.9, se muestran las principales relaciones de compuestos aromáticos aplicadas para distinguir las fuentes de combustión en general del petróleo o pirólisis, destacando el Ant, Phe, Pyr y Fla como los más empleados en los estudios ambientales.

**Tabla No. 6.9. Relaciones diagnósticas para las fuentes de combustión y petróleo.**

Fuente	Indicador	Valor típico: ng/m <sup>3</sup>	Referencia
- Petróleo o derivado - Combustión	Ant/Ant+Phe	< 0.1 > 0.1	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Petróleo - Combustión	Phe/Ant	> 15 < 15	Gui Peng, 2000 Peña- Méndez <i>et al.</i> , 2001
Combustión	Asociación Phe/Ant y Fla/Pyr	< 10 y >1	Gui Peng, 2000 Guadalupe <i>et al.</i> , 2002
Petróleo	Asociación Phe/Ant y Fla/Pyr	<15 y >1	Guadalupe <i>et al.</i> , 2002
- Combustión - Petróleo	Fla/Pyr	> 1 < 1	Gui Peng, 2000 Peña-Méndez <i>et al.</i> , 2001
- Petróleo o derivado - Emisiones por quema de combustibles	Fla/Fla+Pyr	< 0.4 0.4 – 0.5	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Combustión de madera, pasto y carbón - Petróleo o derivado - Combinación de petróleo y combustión - Emisiones biológicas - Emisiones por quema de combustibles - Combustión de diesel - Combustión de gasolina	BaA/BaA+Cry	> 0.5  < 0.2 0.20 – 0.50  0.16 0.33  0.38-0.65	Bucheli <i>et al.</i> , 2004    Gogou <i>et al.</i> , 1996*

- Combustión de combustóleo y diesel		0.43 0.50	
- Combustión de pasto, madera y carbón. - Fuentes distintas del tráfico. - Fuentes de tráfico	BaP/ BeP	> 0.5  < 0.6  > 0.6	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Quema de madera - Combustión de diesel - Combustión de gasolina	Cor/Ind	0.3 1.2 2.2	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Petróleo - Combustión	$\Sigma$ (HAPs de 3-6 anillos)/ $\Sigma$ (HAPs 5 anillos alquilados)	< 0.05 0.8 a 2.0	Jansson <i>et al.</i> , 2000 Guadalupe <i>et al.</i> , 2002
- Fuente pirogénica - Petróleo o derivado	MPhe+Ant/Phe	0.5 5	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Fuente pirogénica - Petróleo o derivado	MFla+Pyr/Pyr	0.3 4	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Petróleo o derivado - Combustión de combustible fósil	Ind/Ind+Bghi	< 0.20 0.20 – 0.35	Bucheli <i>et al.</i> , 2004
- Vegetación incendiada  - Calefacción doméstica  - Combustibles - Combustión de diesel - Combustión de petróleo  - Combustión de gasolina - Combustión de diesel - Emisiones por quema de carbón - Emisiones por quema de madera - Petróleo - Combustión	Bghi/Ind	0.2 – 0.5  1.1  2.5 1.1-1.2 3.5-3.8  0.18 0.37-0.70 0.56  0.62  <1 >1	Wilcke <i>et al.</i> , 1999.  Schulz & Emeis, 2000.      Kavouras, 1999* Gogou <i>et al.</i> , 1996* Pio <i>et al.</i> , 2001* Cereceda-Balic <i>et al.</i> , 2002

\* Citado por Rehwagen *et al.* 2005

Los análisis de estos compuestos en conjunto, describen valores significativamente más elevados para la región de extracción del petróleo ( $p \leq 0.01$ ) con el correspondiente riesgo para la salud de la población que vive en esta área.

Los HPA's encontrados más frecuentemente en las muestras de aire fueron los correspondientes a las familias de polinucleares de más de tres anillos, como el fenantreno, el benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno y benzo (b)fluoranteno y se asociaron principalmente a la fase gaseosa de las muestras. En una menor proporción se encontraron HPA's de alto peso molecular, los que estuvieron asociados al componente particulado de las muestras.

El Fenantreno se asocia generalmente a la combustión incompleta de combustibles fósiles (Botello, 1991). El Criseno es uno de los HPA's observados como componente principal de las muestras de los sitios adyacentes a las instalaciones petroleras. Se ha considerado al criseno como huella digital del diesel y de la gasolina, ya que se produce durante la combustión incompleta de estos compuestos. Botello y colaboradores, 1996; reportaron que el fluoranteno y el pireno se pueden utilizar como huellas digitales de la combustión incompleta de hidrocarburos y que el benzo(a) antraceno, el criseno y el benzo(a) pireno pueden estar también presentes pero en menor grado. Barale *et al*, 1991 reportaron que el fenantreno, indeno(1,2,3-c,d) pireno, el benzo(b) fluoranteno y el benzo(k)fluoranteno son HPA's característicos de la quema de biomasa (madera y pastizales). Estos compuestos también fueron detectados en las muestras de la atmósfera de Tabasco.

Sin embargo los hidrocarburos de menos de tres anillos de importancia en la salud como acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, naftaleno, Benzo (e)pireno no se detectaron, probablemente debido a su alta volatilidad, se degradan fácilmente al tener presiones de vapor altas y al estar expuestos a radiación solar; lo que desencadena reacciones de degradación fotocatalítica.

Algunos autores como Yunker et al (2002), señalan que existen relaciones diagnósticas entre grupos de HPA's, como por ejemplo; la relación Fenantreno + Pyreno, Benzo (a) antraceno+ criseno, indican fuentes de contaminación de HPA's por quema de biomasa

(madera y pastizales), emisiones vehiculares y combustión de carbón. Esta relación se debe a la estabilidad termodinámica ligada al peso molecular, volatilidad y solubilidad de cada compuesto.

**TABLA No. 6.10. Comparación de la concentración entre hidrocarburos con predominio en fase gas y fase partícula ( ng m<sup>-3</sup>).**

Grupo	Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de HPA's en el aire, pg./m <sup>3</sup>		Expuestos (n=34)		No expuestos (n=41)		valor p**
	LD	LC	media (d.e.)	mediana* (10%, 90%)	media (d.e.)	mediana* (10%, 90%)	
<b>Hidrocarburos con predominio en fase gas</b>	LD	LC					
Criseno	13	41	25.73 (17.36)	28.21 (4.42, 44.96)	4.24 (3.69)	2.31 (2.31, 11.12)	<0.001
Benzo(a)Pireno	3	11	15.72 (3.07)	14.58 (12.39, 19.64)	8.93 (0.13)	9 (8.69, 9)	<0.001
Acenafteno	0.1	1	0.53 (0.17)	0.51 (0.35, 0.74)	0.55 (0.30)	0.71 (0, 0.71)	0.9
Benzo(a)Antraceno	12	40	25.42 (12.35)	17.25 (15.48, 41.87)	5.54 (3.34)	3.79 (3.79, 11.75)	<0.001
Benzo(k)Fluoranteno	3	11	24.53 (12.20)	16.04 (15.36, 40.66)	17.20 (4.23)	19.41 (9.32, 19.41)	0.9
Indeno(1,2,3c,d) Pireno	11	35	39.17 (21.76)	35.11 (12.47, 65.47)	53.28 (13.64)	60.43 (27.87, 60.43)	0.3
Total			131.09 (41.24)	118.11 (84.42, 182.98)	89.75 (11.27)	95.65 (68.75, 95.65)	<0.001
<b>Hidrocarburos con predominio en fase partícula</b>							
Fenantreno	0.1	5	0.57 (0.12)	0.6 (0.39, 0.68)	0.95 (1.14)	0.35 (0.35, 3.08)	<0.001
Antraceno	0.1	3	0.30 (0.22)	0.32 (0, 0.53)	0.35 (0.19)	0.45 (0, 0.45)	<0.001
Fluoranteno	1	6	2.42 (1.15)	2.26 (0.97, 3.78)	2.45 (0.10)	2.40 (2.40, 2.63)	<0.001

Benzo(b)Fluoranteno	5	15	7.46 (4.44)	8.05 (1.21, 12.08)	3.57 (3.1 8)	1.90 (1.90, 9.50)	0.02
Total			10.74 (5.45)	12.96 (2.57, 15.34)	7.32 (4.24)	5.1 (5.1, 15.21)	0.05

\*Mediana y percentiles 10 y 90.

\*\*Prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney).

En la Tabla 6.11 se muestran concentraciones totales promedio de los hidrocarburos en los diferentes sitios, encontrando los valores más altos en los sitios con mayor actividad petrolera como Nuevo Torno Largo y Gregorio Méndez, los cuales presentaron concentraciones totales promedio de 273.37 y 231.07 ng/m<sup>3</sup> respectivamente, en estas zonas las fuentes puntuales principales, son las baterías de separación y compresión, quemadores a cielo abierto y la Terminal Marítima Dos Bocas y las menores concentraciones se registraron en los sitios considerados con nula actividad petrolera; Netzahualcóyotl y Uquiná.

Por otro lado, se presentan las concentraciones registradas en los diferentes sitios de cada hidrocarburo de importancia en la salud. Se aprecia que los valores más altos de cada uno de los hidrocarburos de manera individual se presentaron en los sitios con actividad petrolera, en concentraciones hasta de 67.57 ng m<sup>-3</sup>.

Es importante mencionar, que las variaciones en las concentraciones de HPA's en fase gas y partícula se asocian a la falta de constancia de los factores meteorológicos. Diferentes autores reportan, que las concentraciones fluctúan día a día, reflejando los diferentes orígenes de las masas de aire, así como la contribución de las diferentes fuentes de emisión, además de que algunos HPA's reaccionan más rápido debido a su fotoreactividad, combinada con las variaciones en la Temperatura y otros factores meteorológicos (Gigliotti *et al.*, 2000 y Lee, 1999).

**TABLA 6.11. Concentración de HPA's en cada sitio de estudio**

HPA's ( ng m <sup>-3</sup> )	San Miguel n = 7	G. Méndez n = 7	Torno Largo n = 7	Villahermosa n = 7	Netzahualcóyotl y Uquiná n = 7
Fase gas	91.16	165.06	202.2	94.64	144.17
Fase partícula	132.95	66.01	71.47	67.87	19.97
Total	224.11	231.07	273.37	162.51	164.14

<b>Hidrocarburos detectados que representan riesgos a la salud:</b>					
Benzo(a)Antraceno	35.88	26.69	49.4	26.46	8.28
Criseno	52.89	11.94	54.94	16.97	4.16
Benzo(b)Fluoranteno	1.21	27.09	12.08	17.37	12.96
Benzo(k)Fluoranteno	43.26	31.43	52	16.44	21.26
Benzo(a)Pireno	14.9	15.31	25.54	15.75	10.94
Indeno (1,2,3- c,d.)Pireno	26.88	67.57	42.25	37.33	12.13
Dibenzo(a,h)Antraceno	32.48	10.62	12.24	14.27	0
Total	207.5	189.65	248.45	144.59	69.73

\*Los valores de los hidrocarburos corresponden a la mediana obtenida a partir de las muestras en cada sitio, por lo tanto a cada sitio le corresponde sólo un valor de concentración de cada hidrocarburo, se asume que los individuos del mismo sitio estuvieron expuestos a las mismas concentraciones de hidrocarburos.

De acuerdo con la Agencia de Sustancias Tóxicas y al Registro de Desastres de los EUA (ATSDR, 1996), la concentración base de los 16 HPA's en el aire de zonas rurales se encuentra entre 0.02 y 1.20 ng/m<sup>3</sup> y en zonas urbanas entre 0.15 y 19.30 ng/ m<sup>3</sup>.

Aunque no existe un límite establecido por las Normas Oficiales Mexicanas por debajo del cual no exista riesgo de exposición a HPA's en la atmósfera, existen valores establecidos para algunos HPA's, en diferentes países de acuerdo a la National Air Toxics Information Clear in House (NATICH, 1992).

La Tabla No 6.12. establece un punto de comparación de los Hidrocarburos estimados en el Estado de Tabasco con respecto a otros países, aunque por la complejidad de los aerosoles atmosféricos que incluyen cientos de compuestos orgánicos en los cuales aproximadamente el 10 % pueden ser identificados, no existe un rango de concentración predeterminado para cada hidrocarburo como se puede observar en la Tabla, en donde los valores promedio de HPA's tienen una gran discrepancia, debido a las complejas reacciones del carbón orgánico en la atmósfera y a las transformaciones de estos compuestos durante el muestreo, relacionados con los cambios meteorológicos y a los procesos de fotodegradación:

**TABLA 6.12. Límites de HPA's en el aire ambiente de varios países.**

HPA's	valores en el aire ambiente( $\text{ng}/\text{m}^3$ )anual	Lugar	Niveles de HPA's promedio(mensual) enTabasco, ( $\text{ng}/\text{m}^3$ )
Fenantreno	1,300.00	Vermont, USA *	<b>0.57</b>
	0.85-1.0	Río de Janeiro, Brasil*	
	0.52	Ciudad de México*	
Fluoranteno	60	Lousiana *	<b>2.42</b>
	0.15-1.65	Río de Janeiro, Brasil*	
	0.82	Ciudad de México*	
Benzo (a)antraceno	0.57-1.0	Arizona *	<b>40</b>
	0.073-2.01	Río de Janeiro*	
	0.64	Río de Janeiro*	
Criseno	50	Texas*	<b>25.73</b>
	1.2	Ciudad de México*	
Benzo (a) pireno	3	Texas*	<b>15.31</b>
	10	Agencia Ambiental Federal Alemana*	
	0.2-0.35	Flanders, Bélgica*	
	2.8	Taichung, China*	
	2.6	Atenas, Grecia*	
	0.88-10.7	Río de Janeiro, Brasil*	
	1.19	Ciudad de México*	
Dibenzo(a,h) antraceno	0.57	Arizona*	<b>10.62</b>
	1.01	Ciudad de México**	

\*Amador M.O, 2003

\*\* Hernández Mayen S., 2005

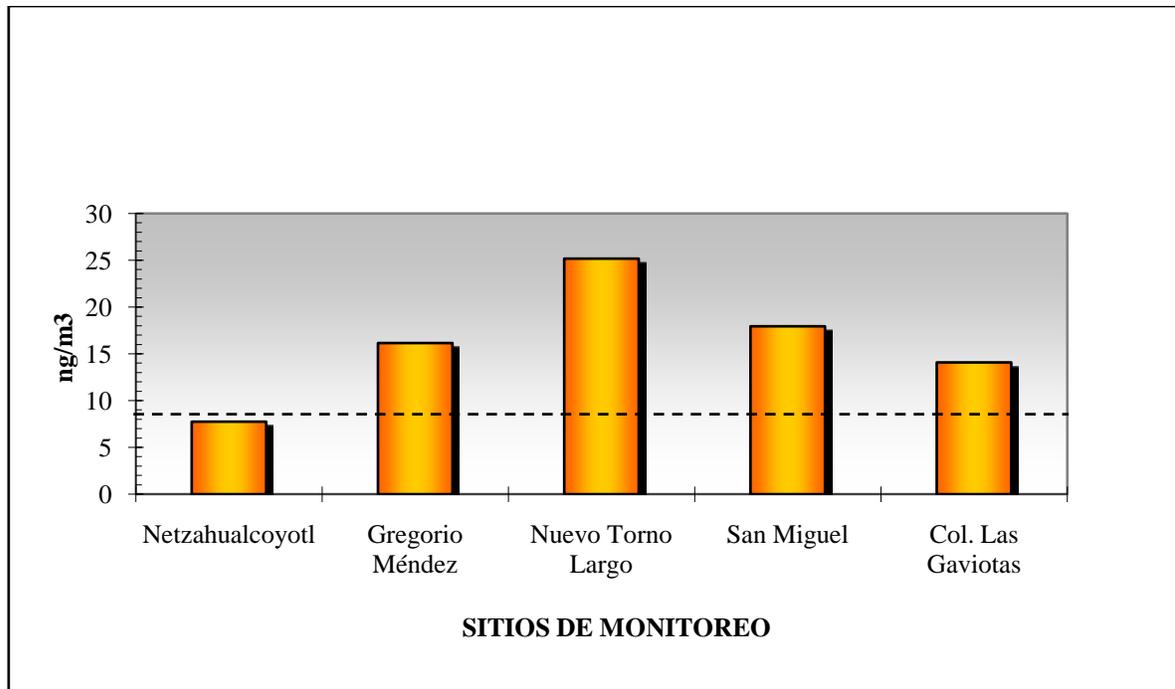
A continuación se presenta una relación de algunos de los HPA's carcinogénicos, encontrados en la literatura con el fin de asociar los valores de hidrocarburos encontrados en las zonas de estudio con los valores potenciales de riesgo a la salud por HPA's por inhalación (Tabla 6.13), de acuerdo a la concentración de cada hidrocarburo:

**TABLA 6.13. Valores potenciales de riesgo de los HPA'S por inhalación.**

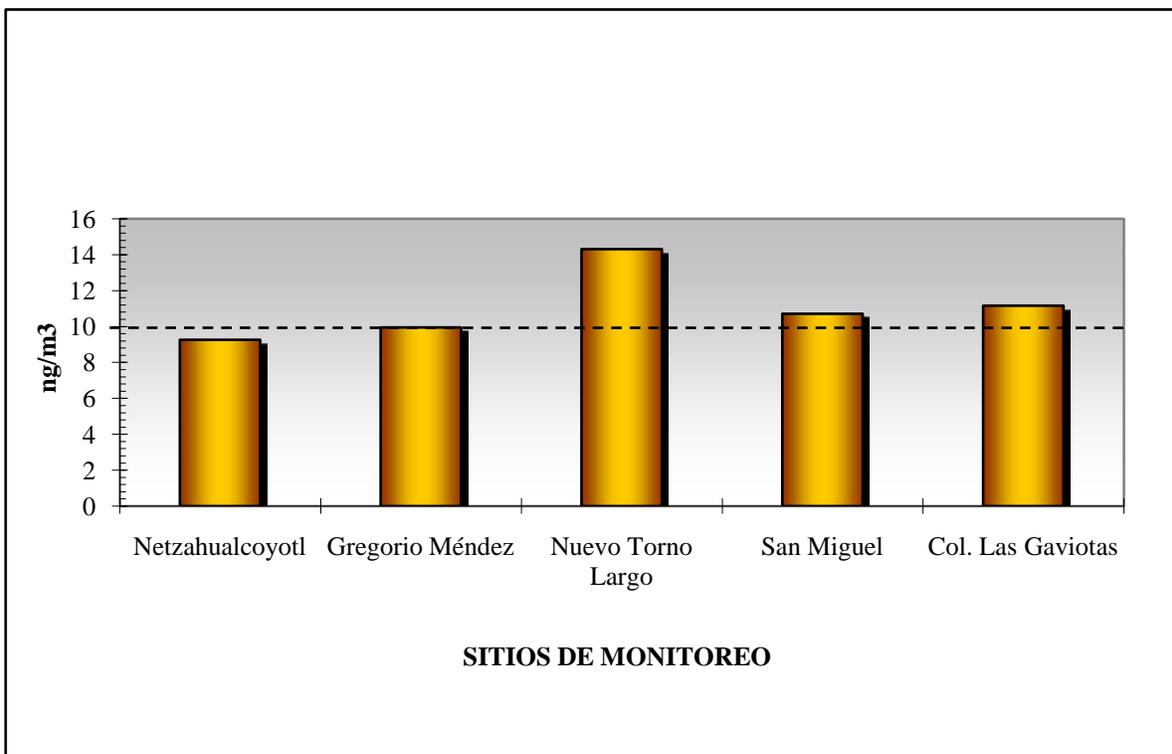
Hidrocarburo Policíclico Aromático (HPA's)	Chemical Abstract Service (CAS) Number	Unidad de Riesgo (ng/m <sup>3</sup> )
Benzo(a)Antraceno	56-55-3	9.09
Benzo(a)Pireno	50-32-8	0.91
Benzo(b)Fluoranteno	205-99-2	9.09
Benzo(k)Fluoranteno	207-08-9	9.09
Criseno	218-01-9	90.9
Dibenzo(a,h)Antraceno	53-70-3	0.83
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	193-39-5	9.09

**Fuente:** Toxic Air Contaminant Document, Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA), California Environmental Protection Agency.

Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos característicos, originados por la quema de madera fueron el dibenzo (a,h) antraceno, benzo(k) fluoranteno e indeno 1,2,3-c,d) y benzo (a) pireno y el compuesto asociado con emisión de gasolina y diesel fue el criseno. Los valores de concentración de HPA's sobrepasaron los valores de unidades de riesgo establecidos por la OEHHA y se encontraron en los diferentes sitios asociados a la fase particulada, predominando en los sitios expuestos de: Torno Largo y Gregorio Méndez. En las gráficas 6.13.1 a 6.13.7 se presentan las concentraciones de HPA's obtenidas, enmarcando con una línea verde, los valores límite de unidades de riesgo (ng/m<sup>3</sup>):



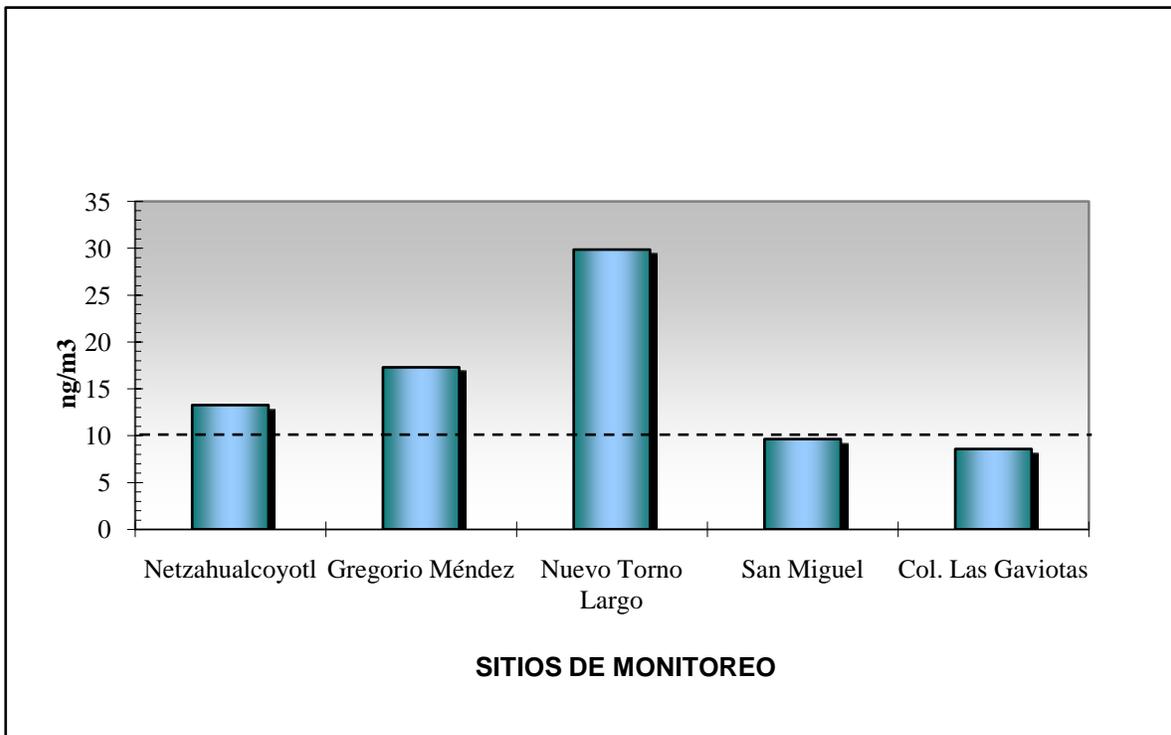
Gráfica 6.13.1. Niveles de exposición a Benzo (a) antraceno



Gráfica 6.13.2. Niveles de exposición a Benzo (a) pireno

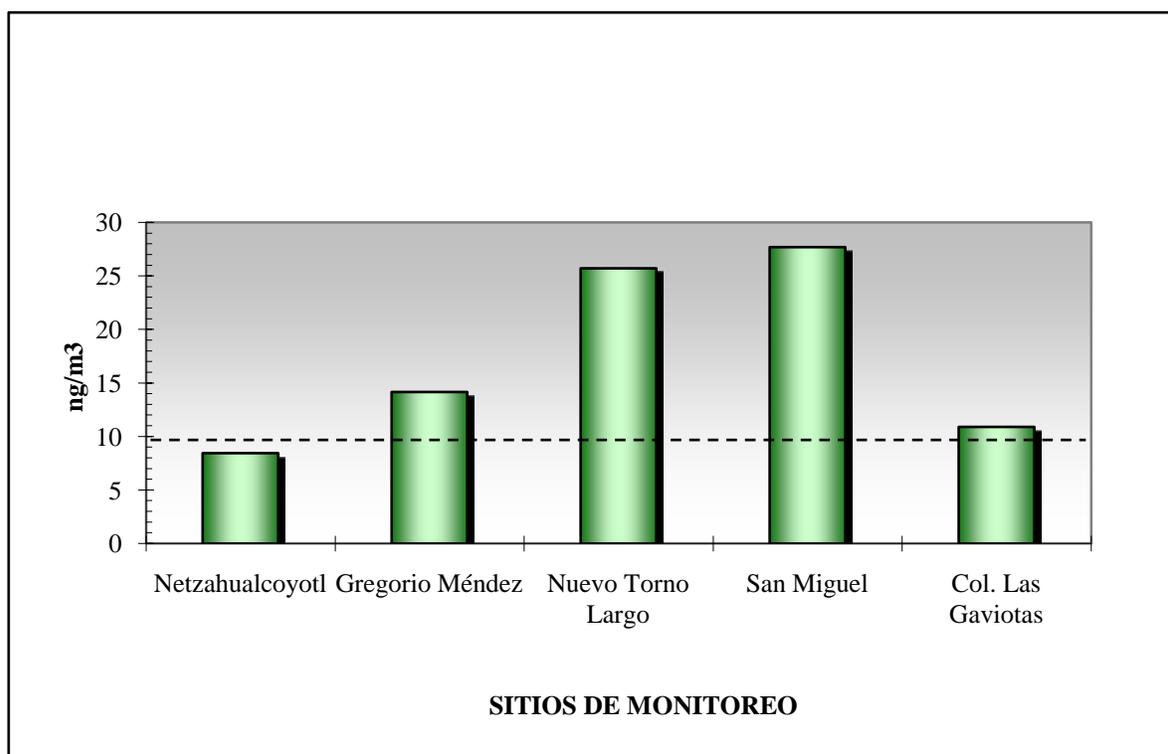
Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos más característicos por la quema de madera fueron el Benzo (b) Fluoranteno, Benzo (k) Fluoranteno e Indeno (1,2,3-cd)Pireno y se encontraron en todos los sitios de muestreo principalmente asociados a fase partícula.

Esto significa que efectivamente estos compuestos provienen de procesos de quemas agrícolas, forestales, basuras y que se encuentran ampliamente distribuidos en todo el Estado de Tabasco. Por el origen del Fenantreno se considera dentro del grupo de compuestos originado por combustión incompleta de combustible fósil, este compuesto se registró solo en una zona suburbana de la ciudad de Villahermosa. Lo cual probablemente se deba a que se relaciona con la combustión de gasolina, ya que el parque vehicular en ese punto es una fuente importante de emisión a la atmósfera de HPA's:



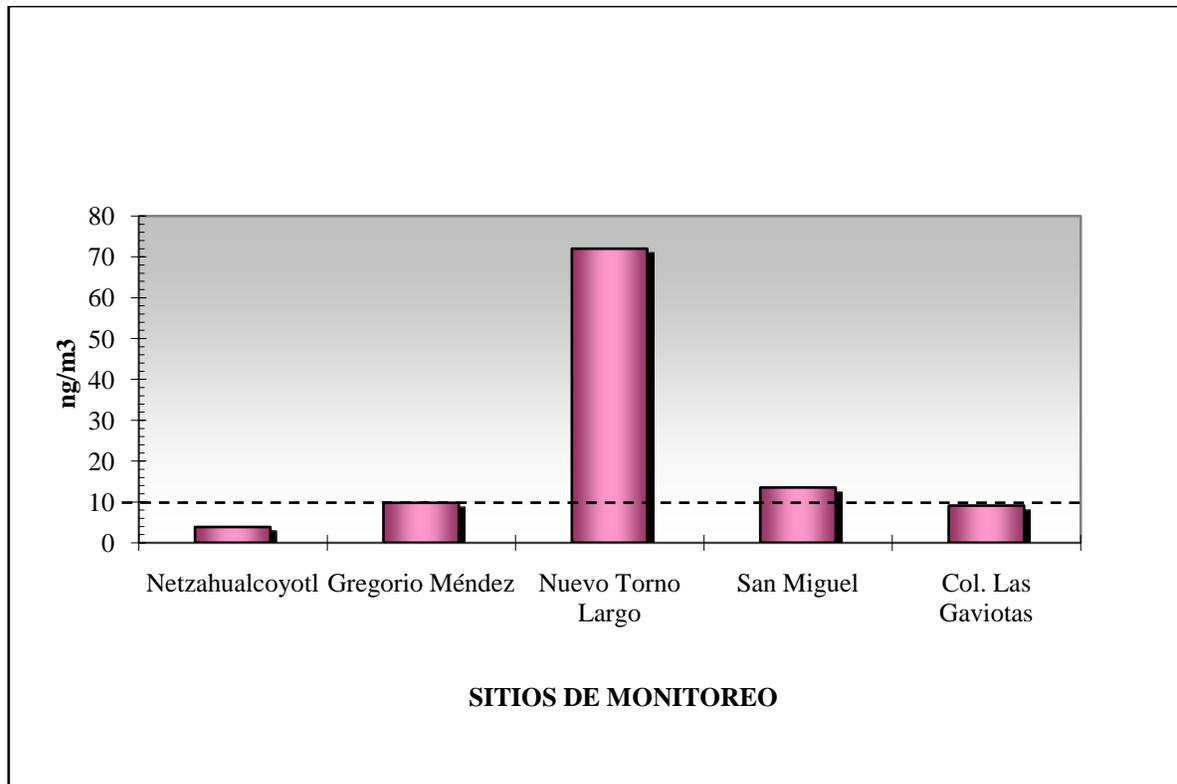
**Gráfica 6.13.3. Niveles de exposición a Benzo (b) fluoranteno**

Las concentraciones más altas de HPAs en la atmósfera se encontraron en las zonas rurales de Nuevo Torno Largo y Gregorio Méndez con actividad de la industria petrolera, es decir en zonas con alta actividad en las baterías de separación y compresión donde se pueden localizar fuentes puntuales como quemadores a cielo abierto y la Terminal Marítima Dos Bocas (TMDB), mientras que las menores concentraciones de HPA's se registraron en la comunidad rural de San Miguel zona con actividad petrolera de Procesamiento de Gas Natural.



**Gráfica 6.13.4. Niveles de exposición a Benzo (k) fluoranteno**

Las concentraciones de estos HPA's en la población de San Miguel 1ª. Secc. pueden ser influenciadas por el parque vehicular de la cabecera municipal de Reforma, por actividades locales y en menor grado por el C.P.G. (Complejo Procesador de Gas) Cactus ya que es la fuente de emisión más cercana a la población, con dirección de viento predominante a favor y una baja velocidad de viento durante el periodo de muestreo.



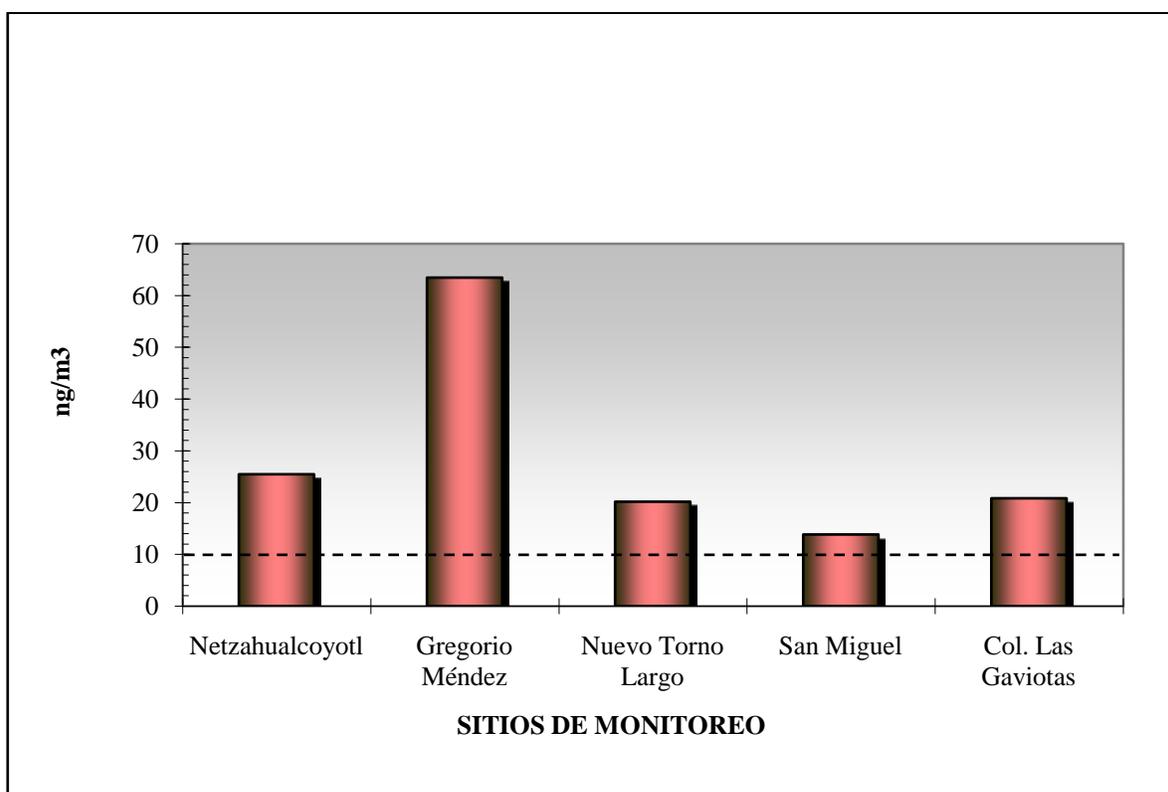
**Gráfica 6.13.5. Niveles de exposición a dibenzo (a,h) antraceno**

Los altos niveles de HPA's, registrados en la comunidad de Nuevo Torno Largo en el período de monitoreo se pueden relacionar con fuentes de emisión provenientes del Golfo de México y actividades locales, debido al intercambio entre los aerosoles marinos y las partículas terrestres (componente horizontal de los vientos), a través de los cuales se transportan los contaminantes (HPAs) desde la tierra hacia el mar y viceversa.

Un ejemplo importante de zona impactada por hidrocarburos cercana a la zona de estudio; Torno Largo es la laguna de Mecoacán, que en estudios realizados por Botello en 1996, se encontraron niveles altos de hidrocarburos en sedimentos (88 ppm). Alrededor de la laguna de Mecoacán se encuentran zonas de explotación petrolera, en las cuales se llevan a cabo actividades rutinarias de perforación y transporte del petróleo, que pueden ocasionar derrames por el aporte continuo de hidrocarburos del petróleo hacia este sistema costero. Además de que en los márgenes de esta laguna, se encuentra la terminal petrolera de dos bocas (TMDB); cuya capacidad de almacenamiento es de seis millones de barriles de petróleo crudo y en cuya movilización, carga y descarga de hidrocarburos se liberan cantidades

importantes de desechos conteniendo HPA's, que tienen como destino final el ecosistema lagunar, ya que en estos lugares el tráfico de buques comerciales y petroleros es intenso, por lo que es considerada como una zona de alto riesgo para las poblaciones que habitan alrededor de este cuerpo de agua y se alimentan de la pesca.

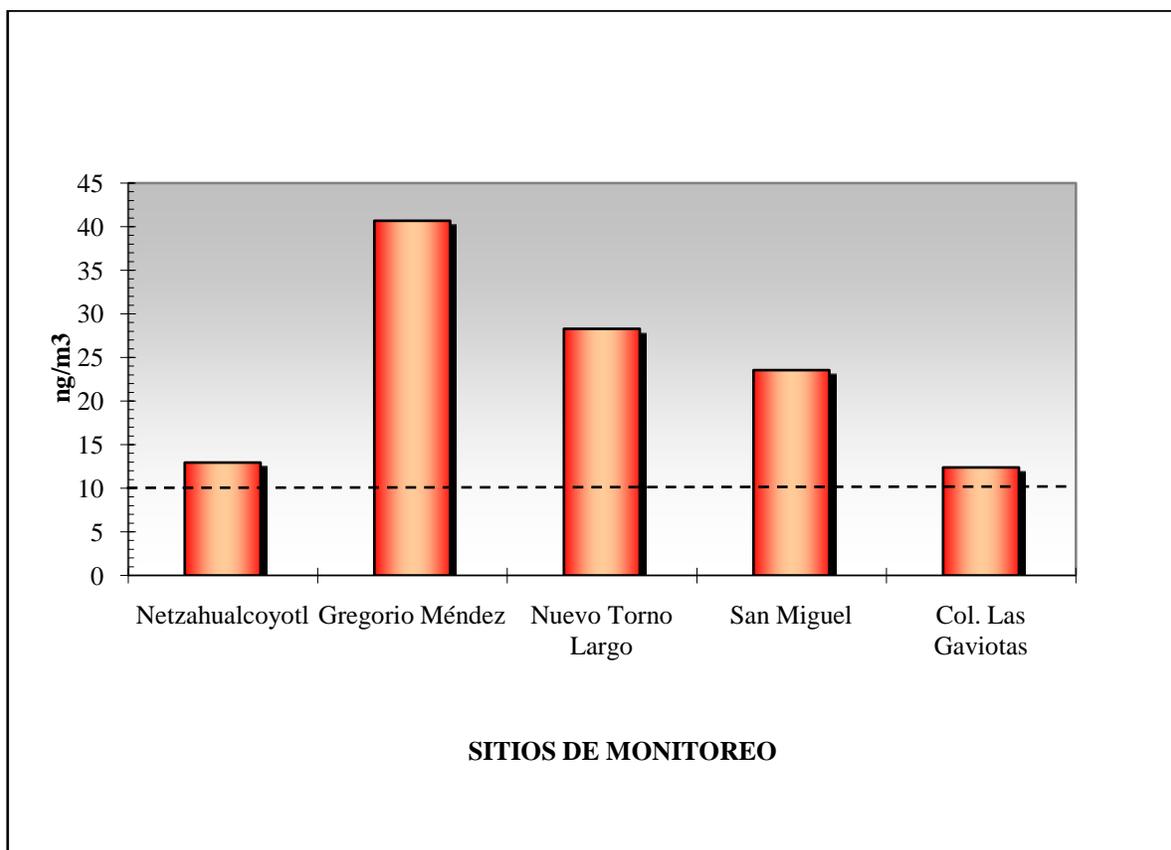
Otro aporte importante de hidrocarburos en las zonas costeras cercanas al punto de muestreo Torno Largo, son las plataformas petroleras de PEMEX, cuyos contaminantes se distribuyen en los ecosistemas de la región por la acción de las corrientes y los vientos dominantes.



**Gráfica 6.13.6. Niveles de exposición de Indeno (1,2,3,c,d) pyreno**

El segundo sitio de muestreo que presentó valores altos de HPA's, fue Gregorio Méndez, ya que este punto además de los aportes locales de hidrocarburos, recibe emisiones a la atmósfera a 100 km de distancia, provenientes de quemadores, campos petroleros, una petroquímica, 78 instalaciones de procesamiento primario y una terminal marítima (Dos Bocas), así como el aporte de hidrocarburos provenientes de lagunas costeras (Botello, 1990),

además del aporte de quemas forestales, de basura y parque vehicular del municipio de Comalcalco y Paraíso.



**Gráfica 6.13.7. Niveles de exposición del Criseno (Valor > 90.9 u. riesgo)**

La Ciudad de Villahermosa, se encuentra influenciada por las diversas fuentes de emisión puntuales y por el parque vehicular. En el poblado de Netzahualcóyotl influye principalmente la actividad agropecuaria es decir la quema de basura, forestal y ciertas costumbres culturales como es la cocción de alimentos con leña o carbón.

Los HPA's Totales de origen pirogénico, donde se lleva a cabo combustión incompleta de combustible fósil, los más característicos fueron el Criseno, Benzo(a)Antraceno y Benzo(a)Pireno, las mayores concentraciones de estos compuestos se encontraron en las poblaciones de Nuevo Torno Largo, Gregorio Méndez y San Miguel, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Las temperaturas mayores en el período de monitoreo se presentaron en las poblaciones de Netzahualcóyotl y San Miguel, los cuales presentaron valores muy bajos de HPA's, principalmente en los compuestos aromáticos de 3 a 4 anillos. Lo cual es probable que pueda asociarse a una alta presión de vapor, propiedad que los hace más volátiles y a la degradación producida por temperaturas altas.

Los niveles mayores de riesgo para la salud se presentaron en Nuevo Torno Largo y Gregorio Méndez, ya que en ambas comunidades se registraron las mayores concentraciones de Benzo(a)Antraceno, Benzo(a)Pireno, Benzo(b)Fluoranteno, Criseno, Dibenzo(a,h)Antraceno e Indeno(1,2,3-cd)Pireno, reportados por la Toxic Air Contaminant Document, Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA) como prioritarios por desencadenar procesos cancerígenos.

La siguiente tabla (No. 6.14), da una idea de comparación, de los valores de HPA's reportados en la atmósfera de varios países, las concentraciones no presentan un rango de valores homogéneo, debido probablemente al periodo de muestreo estacional, a la variación de los factores meteorológicos y a la compleja reactividad de fotodegradación de cada uno de los compuestos de HPA's en la atmósfera.

**Tabla No. 6.14. Comparación de las concentraciones de HPA'S en la atmósfera de varios países.**

PAIS	Concentración HPA's (ng/m <sup>3</sup> )	Tipo de Medición
Sur de la Cd. México	208	Fase particulada, 1998
Londres, Reino Unido	166	Fase gas y partícula, 1992
E.E.U.U.	56	Fase gas y partícula, 1982
Viena, Austria	412	Fase gas y partícula, 1992
<b>Tabasco, México</b>	<b>200.17</b>	<b>Fase gas y partícula, 2,000</b>
Ciudad de México( sur)	7.84	Fase gas y partícula, 2005

Aunque pueden existir diferencias entre los índices de HPA's establecidos para climas templados comparados con los obtenidos para climas tropicales sin embargo se puede observar que en diversos países europeos han establecido valores medio anuales de BaP entre 0.7 y 1.3 ng/m<sup>3</sup> (Vera *et al*,2003); de acuerdo a los resultados obtenidos, las concentraciones

de este compuesto estuvieron por arriba de los límites establecidos como unidades de riesgo de la OEHHA, aunque una mejor evidencia sería el aporte de datos obtenidos de HPA's en Tabasco durante un año.

En otros estudios realizados en Bangkok, Tailandia, identificaron el riesgo a la salud de niños en edad escolar expuestos a HPA's en zonas urbanas con alta densidad vehicular y encontraron valores de Hidrocarburos promedio en la atmósfera de  $30.39 \pm 5.80 \text{ ng/m}^3$  con respecto a los niños cuyas escuelas se encontraban en zonas rurales ( $5.78 \pm 1.08 \text{ ng/m}^3$ ), esto pone de manifiesto que las emisiones de hidrocarburos originados por el parque vehicular contribuyen de manera importante a la concentración de HPA's. (Tuntawiroon *et al.*, 2007).

Los HPA's conformados por 3 y 5 anillos bencénicos como benzo(a) antraceno y criseno, se originan a través de procesos a altas temperaturas o pirólisis principalmente por la quema de combustibles fósiles. Por ejemplo, el Fenantreno es uno de los compuestos más característicos y abundantes en áreas de contaminación por petróleo cuyas fuentes de origen son procesos pirolíticos y productos de desecho de la industria petrolera

#### 6.4 .- Daño Genotóxico en las Poblaciones

Con la finalidad de describir el comportamiento de cada uno de los biomarcadores de daño temprano en la población de estudio, se obtuvieron los valores promedio de cada uno de los biomarcadores estimados, para evaluar si se encontraban fuera de rango de acuerdo a la literatura, como se muestra en la Tabla No. 6.15:

**TABLA 6.15.- Evaluación de los biomarcadores en población infantil.**

Biomarcador	Media (d.e.)	Mediana (10, 90%)*	Valor mínimo	Valor máximo
<b>Micronúcleos</b>				
Micronúcleos por células† (n=73) logmn2000	2.728 (1.969)	2.999 (1, 6.58)	1	13.9 99
Índice de división nuclear (n=72)	1.364 (0.197)	1.4 (1.213, 1.517)	0.39	1.82
<b>Cinética de proliferación celular</b>				

Índice mitótico (n=71)	0.038 (0.010)	0.039 (0.022, 0.053)	0.014	0 .065
Índice de replicación (n=71)	2.575 (0.153)	2.57 (2.414, 2.776)	1.84	2.90
Intercambios de cromátides por célula ((n=71)	6.370 (0.871)	6.40 (5.276, 7.382)	4.35	9.85
Intercambios de cromátides por cromosoma (n=71)	0.141 (0.019)	0.141 (0.118, 0.166)	0.099	0.21 8
<b>Ensayo Cometa</b>				
Tamaño de cola en micras† (n=70) t_h	18.430 (1.790)	16.655 (6.170, 50.180)	5.190	59.7 79
Razón cola/cabeza (n=70)† cola_t_	1.049 (1.903)	0.949 (0.46, 2.531)	0.309	7.33 0

\*Mediana y percentiles 10 y 90.

†El cálculo se hizo con el logaritmo natural y posteriormente se sacó el

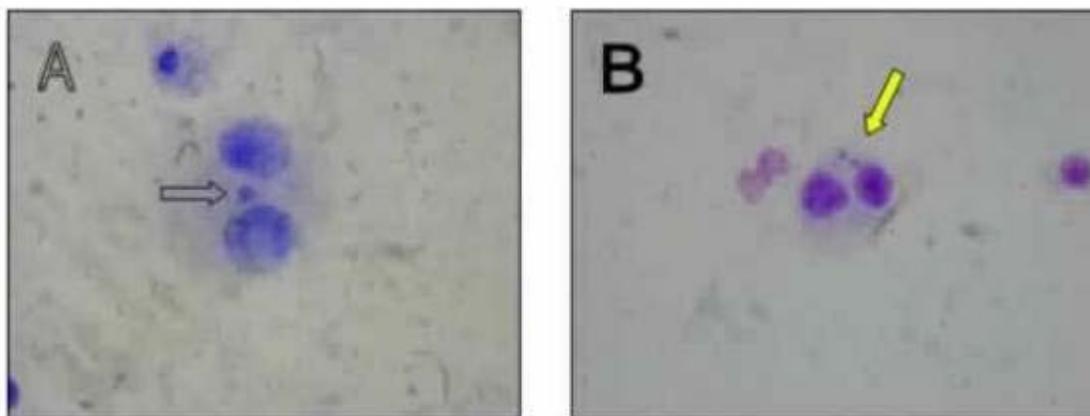
La primera evaluación citogenética en los ensayos consistió en la determinación de la “viabilidad” celular de las muestras de linfocitos de sangre periférica, con el objeto de certificar antes de llevar a cabo los diferentes ensayos, el porcentaje de las células que se encontraban viables y corroborar que no habían sufrido daño al ser transportadas del lugar de estudio al laboratorio, para lo cual se llevó a cabo la aplicación de la técnica de exclusión por azul tripano (Morley, 2006), que consistió en contabilizar las células en la cámara de Neubauer, para poder establecer el porcentaje de células refringentes o células vivas.

El porcentaje de las células vivas fue alto en todos los sitios (95%), lo cual significa que las muestras estuvieron aptas para los análisis en los ensayos. El cuadro siguiente, presenta los porcentajes de viabilidad de todos los sitios:

**TABLA 6.16. Porcentaje de viabilidad celular en las muestras de sangre periférica en niños que habitan en los diferentes sitios de estudio.**

SITIO	% de Viabilidad celular
Uquiná y la Loma, Balancan	96.86
Netzahualcóyotl, Balancan	97.20
Gregorio Méndez 1ra. Secc., Comalcalco	96.75
Nvo. Torno Largo, Paraíso	95.33
San Miguel 1ra. Secc, Reforma	97.90
Col. Las Gaviotas, Centro	98.70

En la figura siguiente, se observan los micronúcleos típicos de una célula binucleada encontrados en uno de los individuos de estudio y que corresponde al sitio de Torno Largo:



**Figura No. 6.15.A Células binucleadas con micronúcleos.** La imagen “A” muestra un micronúcleo típico entre los dos núcleos de una célula en división. Se puede observar que tiene la misma densidad de la cromatina nuclear y se encuentra dentro del citoplasma de la célula binucleada. La imagen “B” muestra una célula binucleada con dos micronúcleos (flecha).

Fenech y Morley (1985), establecen que los niveles de la frecuencia basal de micronúcleos (MN) en niños sanos es de  $4.4 \pm 2.6$  en 500 células binucleadas. Para uniformizar criterios en el número de Micronúcleos a nivel internacional se desarrolló el proyecto “HUMN” (Human Micronucleus International Collaborative Study), estableciendo las frecuencias basales de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica de poblaciones infantiles analizadas en varios laboratorios del mundo registrando valores promedio entre **4.48 y 5.70** (con un intervalo de confianza entre 3.35 a 5.98 en 1000 células binucleadas) (Fenech, *et al*, 2003; HUMN Project; Bonassi, 2007).

En un estudio en el que se analizó la frecuencia basal de micronúcleos en niños expuestos a agentes genotóxicos ambientales, se encontró que la frecuencia de MN aumenta con la edad, el rango promedio de micronúcleos oscilaba entre **1.70 y 9.92** en niños desde 1 año de edad hasta jóvenes de 19 años. (Neri, *etal* 2005). En la Tabla 6.17 se muestra la relación entre el rango de edades y la media de MN encontrada por diferentes autores. En donde es importante señalar que el promedio de micronúcleos arrojado en el presente estudio presenta valores considerados dentro del rango promedio mundial.

Bonassi y Fenech (2001), también afirman que la frecuencia basal de los micronúcleos aumenta con la edad, esto se demuestra en el proyecto mundial de micronúcleos, donde varios laboratorios intercalibraron el protocolo para evaluar MN en células binucleadas encontrando un rango de frecuencias promedio entre **1 y 1.5** y que corresponden a niños y jóvenes desde 0 a 20 años de edad, en ambos sexos y aumenta significativamente el número de micronúcleos con la edad después de los 30 años, presentando las mujeres un incremento de MN mayor al de los hombres.

**TABLA No. 6.17. Frecuencia de Micronúcleos reportados en la literatura mundial en niños. (Neri, *et al* 2005):**

Estudios Mundiales realizados en MN en niños			
Referencia	No. de niños referidos (No. Total de sujetos en estudio)	MN (media $\pm$ DS)	Rango de edades (años)
Shi et al. 2000	20 (68)	1.70 $\pm$ 1.83	0–10
Barale et al. 1998	136 (1,650)	2.20 $\pm$ 2.22	0–19
Zotti-Martelli et al. 1999	30 (72)	2.26 $\pm$ 2.35	15 $\pm$ 2.0
Fellay-Reynier et al. 2000	20 (41)	2.71 $\pm$ 2.60	0–18
Vleminckx et al. 1997	33 (220)	2.94 $\pm$ 2.46	6–15
Migliore et al. 1991	15 (45)	4.14 $\pm$ 1.75	1–12
Maluf and Erdtmann 2001	30 (74)	4.65 $\pm$ 2.25	0–17
Livingston et al. 1997	31 (80)	5.16 $\pm$ 2.51	4–14
Dulout et al. 1996	12 (44)	5.58 $\pm$ 5.51	8–14
Da Cruz et al. 1994	16 (276)	7.33 $\pm$ 3.88	1–18
Bilban and Vaupotic 2001	20 (105)	9.00 $\pm$ 3.80	8–12
Fenech et al. 1997	11 (116)	9.80 $\pm$ 3.32	12–15
Mikhalevich et al. 2000	10 (30)	9.92 $\pm$ 2.70	14–17
<b>*Gamboa et al.2009</b>	<b>73(75)</b>	<b>2.72<math>\pm</math> 1.96</b>	<b>6-15</b>

Barale y Chelotti (1998); llevaron a cabo un análisis en 1,650 individuos sanos, para analizar la frecuencia de ICH y MN en zonas urbanas (Pisa, Italia) y los compararon contra individuos de zonas suburbanas con hábitos fumadores, encontrando una relación lineal en el número de intercambios relacionada con la exposición al humo del cigarro, incrementándose los valores de ICH en individuos que habían estado expuestos al humo del cigarro, presentando valores de ICH de **8.09 ± 1.88** comparados con los individuos que no habían estado expuestos al humo del cigarro, cuyos valores fueron de **7.54 ± 1.61**.

Es importante destacar que en la literatura se han descrito los niveles basales de ICH por célula en linfocitos de individuos no expuestos a mutágenos con un rango normal de **0 a 16** y los ICH por cromosoma con una frecuencia de **0 a 0.34**. El número de ICH depende de las variaciones en las concentraciones utilizadas del análogo Brdu en los cultivos de linfocitos (Gonsebatt, 1994). Y para el caso del Índice Mitótico, el valor histórico promedio registrado en México se encuentra en **0.025 ± 0.002** y el Índice de Replicación en **2.56 ± 0.10** (Gonsebatt *et al*, 1995).

En un estudio en poblaciones infantiles de Polonia en edades entre 5 y 14 años que vivían en dos ciudades muy contaminadas, se les aplicó una batería de biomarcadores de daño temprano y mostraron valores promedio de MN de **4.44** en 1000 células binucleadas y una frecuencia de ICH con un rango de **6.24 y 10.06**, asumiendo como causa principal del daño genotóxico a la exposición de HPA's producto de emisiones por combustión de hidrocarburos en estufas en interiores. (Mielzyńska *et al* 2006).

Al comparar el presente estudio con los valores establecidos en la literatura Internacional; el rango de frecuencias de MN registrado en la población infantil de estudio se encuentra dentro del rango de valores en las últimas investigaciones a nivel mundial, los cuales tuvieron valores desde **1** hasta **14** MN, con exposición o sin exposición a diferentes compuestos, con un promedio de **2.72**. En relación a los ICH por célula de la población del presente estudio, se encontraron valores dentro del rango de frecuencias normales de ICH reportados en la literatura mundial (promedio de ICH **6.37**); los cuales fueron de **5.97 a 6.85**.

En el caso de los resultados del Ensayo cometa los valores se encuentran dentro de rango característico de genotoxicidad, de acuerdo a la literatura, por ejemplo; un estudio sobre el riesgo potencial de exposición a partículas asociadas a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's), en niños que habitan megaciudades como Bangkok, Tailandia, con elevado tráfico vehicular, muestra que los niños son más vulnerables a impactos en la salud asociados con la exposición a contaminantes genotóxicos que los niños que viven en la provincia y tienen mayores riesgos a la salud de desarrollar ciertos tipos de cáncer. En el estudio los valores encontrados en el ensayo cometa muestran; que la longitud de cola del cometa tuvo una media de  $1.93 \pm 0.09 \mu\text{m}$  y un momento de cola (diámetro del Núcleo del Cometa) de  $0.23 \pm 0.01 \mu\text{m}$  (Tuntawiroon *et al*; 2007).

En otro estudio realizado en Croacia (Nevenka y Vera, 2001), evaluaron a personal Médico de un hospital expuesto a antineoplásicos para ver como influye la aplicación de fármacos en el daño genotóxico, para lo cual se evaluò el daño al ADN utilizando el ensayo cometa que presentó los siguientes resultados: La longitud del cometa mostró valores promedio de  $17.46 \pm 1.99 \mu\text{m}$  en sujetos expuestos y  $12.55 \pm 0.82 \mu\text{m}$  en el grupo control. El Momento de cola (radio del núcleo), fue de  $14.31 \pm 2.16 \mu\text{m}$ .

La Tabla 6.18 muestra los valores promedio de cada parámetro de la batería de biomarcadores evaluados y los diferentes sitios de muestreo, en donde según el grado de exposición a hidrocarburos se esperaba obtener daño significativo en los linfocitos de la población de estudio, sin embargo solo algunos parámetros como son; IR e ICH mostraron valores ligeramente por arriba de la media registrada en los controles históricos del Laboratorio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, asimismo en un estudio realizado en individuos expendedores de gasolina y en boleadores de calzado (Galicia, 1998), utilizando el ensayo cometa se encontraron valores por arriba del rango normal en la longitud de la cola del cometa con respecto al núcleo, según la literatura.

En el presente estudio los valores de longitud de cola del cometa presentaron lecturas mayores a los registrados en la literatura ( $40.45 \mu\text{m}$ ) con diámetros de cola de  $2.74 \mu\text{m}$ . Por lo que inferimos que el daño genotóxico fue importante y se relaciona con el sitio de estudio de mayor exposición a hidrocarburos (Nvo. Torno Largo), debido a las características

ya mencionadas como son los diversos procesos que se llevan a cabo alrededor de la zona como es el manejo, emisión, transporte y distribución de petróleo y productos de combustión.

**TABLA 6.18. Valores obtenidos en la batería de biomarcadores aplicados a la población infantil en cada sitio de estudio**

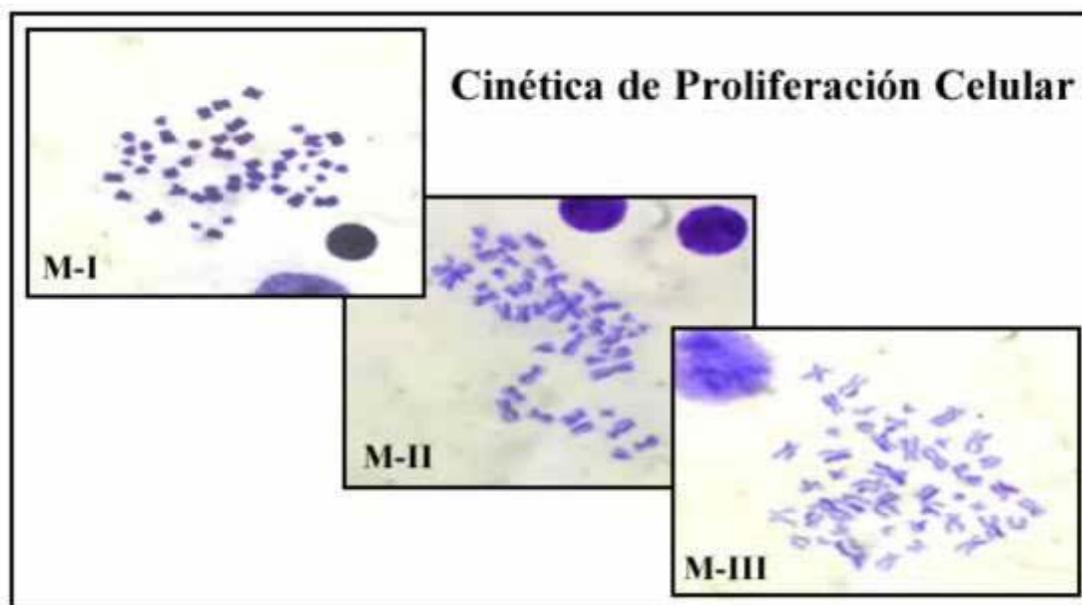
Biomarcador	San Miguel n=10	Gregorio Méndez n=12	Torno Largo n=10	Villa Hermosa n=9	Netzahualcóyotl (c) n=15	Uquiná (c) n=17	p <0.001
	media,	Media	Media	media	media	media,	
	mediana	mediana	mediana	mediana	mediana	mediana	
Micronúcleos en 1,000 células† (n=73)	4.06	1.698	3.309	<b>*4.863</b>	2.321	2.176	0.001**
	3.999	1.414	3.464	8	2	2.999	0.003
Índice de división nuclear (n=72)	1.413	1.314	<b>*1.443</b>	1.311	1.258	1.450	0.001**
	1.445	1.325	1.435	1.38	1.34	1.460	0.001**
<i>Cinética de proliferación celular</i>							
Índice mitótico (n=71)	0.03	0.038	<b>*0.045</b>	0.026	<b>*0.045</b>	0.038	0.001**
	0.031	0.038	0.043	0.022	0.044	0.040	0.001**
Índice de replicación (n=71)	<b>*2.777</b>	2.521	2.554	2.457	2.541	2.601	0.001**
	2.81	2.555	2.56	2.505	2.54	2.595	0.001**
Intercambios de cromátides por célula (n=71)	6.261	6.52	<b>*6.854</b>	6.59	5.977	6.198	0.1
	6.4	6.44	6.89	6.01	5.75	6.150	0.04
Intercambios de cromátides por cromosoma (n=71)	0.14	0.146	<b>*0.15</b>	0.146	0.131	0.137	0.1
	0.143	0.141	0.151	0.132	0.126	0.136	0.05
<i>Cometa</i>							
Tamaño de cola en micras† (n=70)	12.947 13.574	15.893 15.775	<b>*40.454</b> 45.63	18.564 14.896	21.024 22.34	13.276 13.484	0.01 0.001**

Razón cola/cabeza† (n=70)	0.814 0.848	0.954 0.974	<b>*2.748</b> 2.719	0.026 0.759	1.074 1.15	0.703 0.702	0.01 0.001**
------------------------------	----------------	----------------	------------------------	----------------	---------------	----------------	-----------------

Comparación de medias con ANOVA \*Valor más alto registrado en cada biomarcador p<0.001 †El cálculo se hizo con el logaritmo natural y posteriormente se sacó el exponencial. \*\*valores con diferencias significativas

Para llevar a cabo una comparación entre los valores encontrados del ensayo cometa y los diferentes sitios de estudio, se aplicó una prueba estadística NO paramétrica de comparación de medianas, por el tamaño de la muestra en cada sitio, ya que los datos de la media del ensayo cometa no presentaron una distribución normal.

Para analizar la citotoxicidad se midieron las alteraciones en la proliferación de los linfocitos humanos; Índice Mitótico (IM) y la Cinética de Proliferación Celular (CPC) y la genotoxicidad al ADN se evaluó mediante la frecuencia de ICH, Micronúcleos y el ensayo cometa. En la figura No. 6.15.B, se muestran las etapas de división celular para evaluar los cromosomas de células que se han dividido una (MI), dos (MII) y 3 o más veces (MIII).

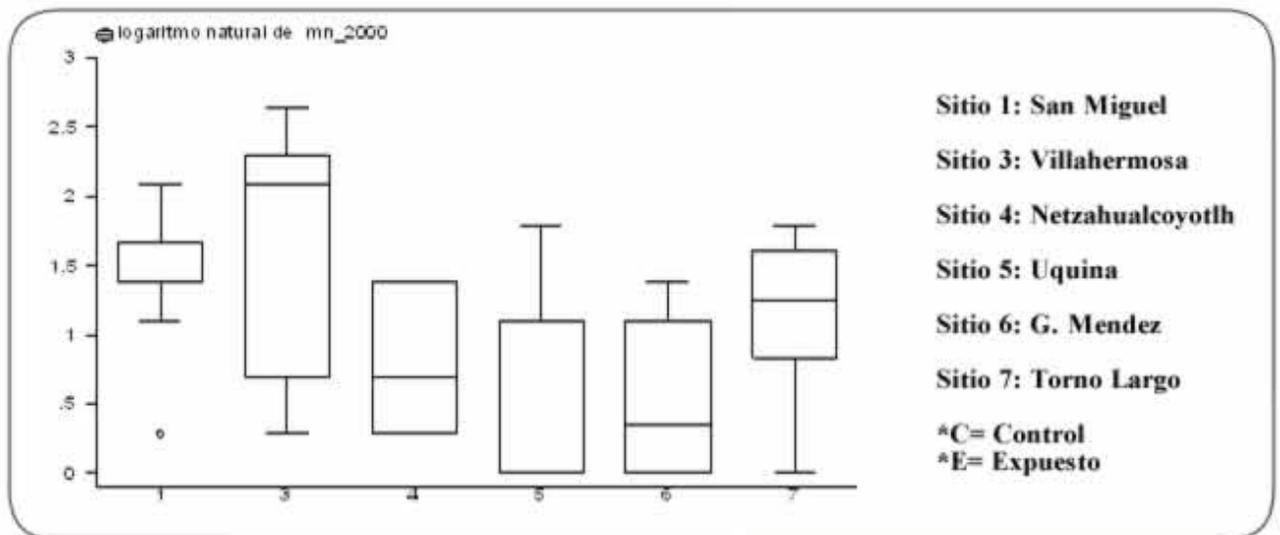


**Figura 6.15.B. Cinética de Proliferación Celular: Primera División Celular (MI); Segunda División Celular (MII) y Tercera División Celular (M3).**

En relación a los biomarcadores que presentaron los valores de genotoxicidad y citotoxicidad más altos en los diferentes sitios de estudio; el sitio Villahermosa mostró valores significativos en la frecuencia de micronúcleos; el sitio considerado con mayor impacto por HPA's fue Torno Largo, el cual tuvo valores significativos en el índice mitótico, ensayo cometa y aunque los valores de Intercambio de Cromátides Hermanas fueron altos, no presentaron diferencias significativas. El sitio San Miguel presentó los valores más altos en cuanto al índice de replicación de la cinética de proliferación celular.

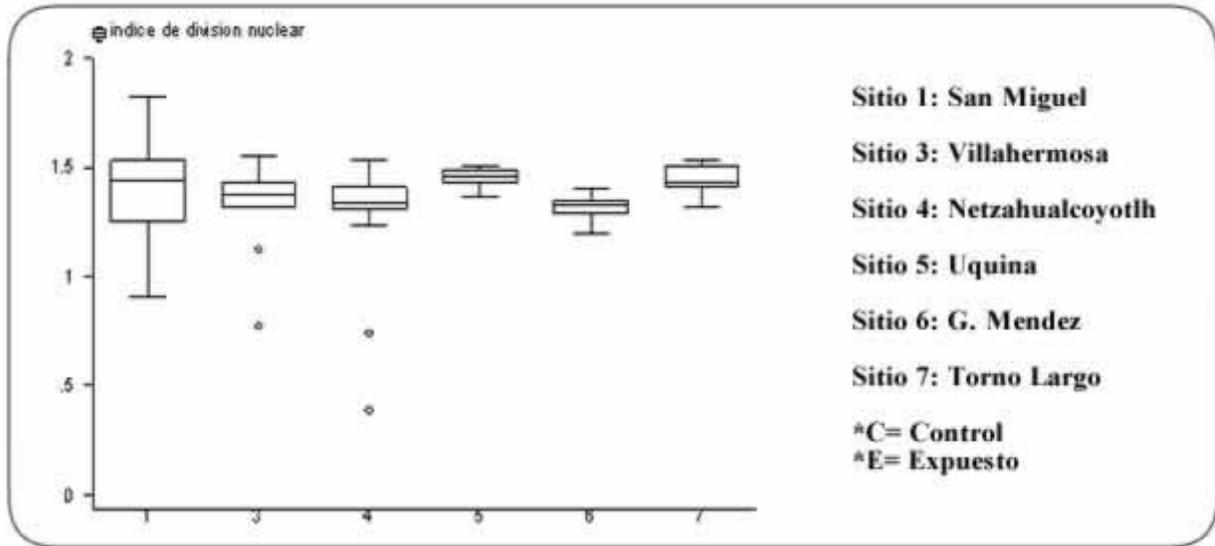
La Frecuencia de MN, longitud de migración del ADN y la relación cabeza/cola en el ensayo cometa, en su escala original no cumplieron con los supuestos de la regresión lineal por lo que se transformaron los modelos lineales a modelos con el *Logaritmo Natural* en cada parámetro de los ensayos de micronúcleos y cometa; para el resto de los modelos se utilizaron los biomarcadores en su escala original.

Las gráficas de caja para la frecuencia de MN, muestran una gran dispersión entre todos los sitios de estudio con respecto a la mediana. Los valores se encuentran dentro del rango normal y la frecuencia mayor de Micronúcleos fue para el sitio Villahermosa, que presentó diferencias significativas. (Gráfica 6.13.8):



**Gráfica 6.13.8. Modelo de caja de la frecuencia de Micronúcleos en los diferentes sitios de estudio. \*significativo  $p < 0.001$**

En relación al parámetro Índice de División Nuclear, los valores más altos fueron para el sitio No. 1 (San Miguel) y no mostraron diferencias significativas y el rango de los valores de IDN entre los grupos de estudio fueron normales, sin diferencias significativas.



**Gráfica 6.13.9. Modelo de caja para el índice de división nuclear en los diferentes sitios de estudio. \*significativo  $p < 0.001$**

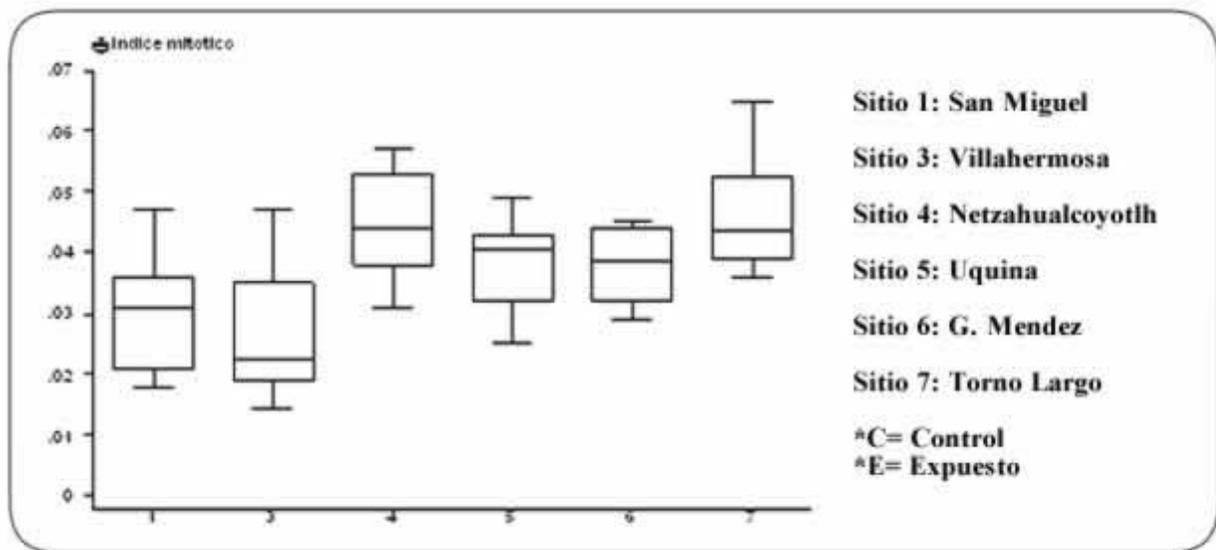
En un estudio de exposición ocupacional desarrollado por Celik A. y Akba E, (2005), analizaron la exposición a los vapores de la gasolina en expendedores de gasolina en Turquía, en donde a través del uso de biomarcadores de daño temprano como ICH, IM y CPC, establecieron las diferencias con respecto al grupo control y observaron que el grupo expuesto presentaba diferencias significativas en los 3 parámetros y concluyen que en los individuos fumadores y expuestos a petróleo; el índice mitótico y el índice de replicación decrece.

En cuanto al Índice Mitótico, el valor más bajo fue para el sitio Villahermosa y el más alto en los sitios: Netzahualcáyotl y Nvo. Torno Largo, no presentando diferencias significativas entre los sitios de estudio y los niveles encontrados en los sitios San Miguel y Villahermosa muestran valores normales de proporción de células en metafase como se observa en la gráfica 6.13.10.

El grupo que presentó un índice mitótico más bajo, significa un crecimiento de células más lento durante la fase de mitosis en la 2ª y 3ª división. Cabe mencionar que los valores normales para el Índice Mitótico reportados en la literatura se encuentran entre 0.025 y 0.035 y los valores encontrados en Netzahualcóyotl y Nvo. Torno Largo, estuvieron por arriba de este rango, lo que puede deberse a factores socioeconómicos, tales como la mala nutrición de los niños de esa zona.

El índice mitótico permite determinar e identificar las metafases de células que han completado uno o más ciclos de división, revela la proporción de núcleos que se encuentran en metafase a diferencia de los otros parámetros que evidencian un daño genotóxico; al aumentar la proporción de los valores de IM bajos, demuestra daño citotóxico.

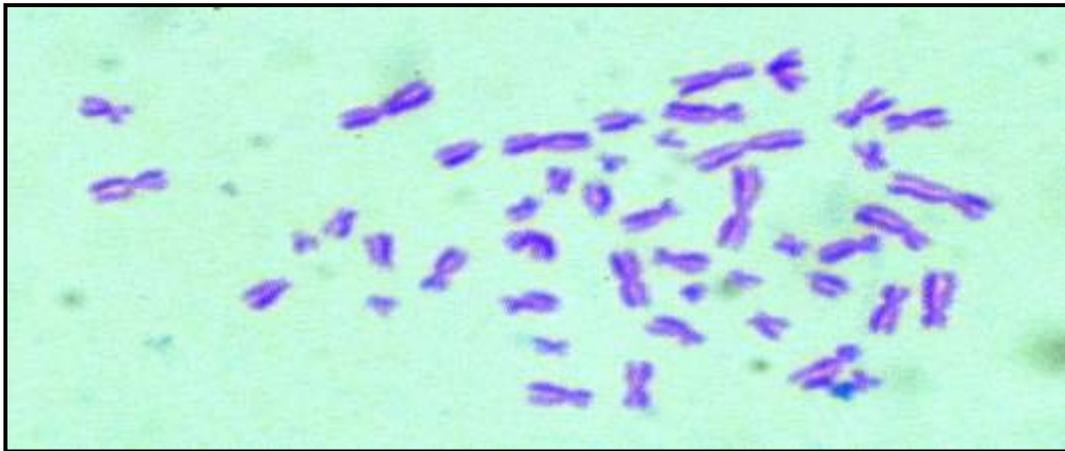
Probablemente la causa de las frecuencias bajas en el IM e IR, en el estudio se deba a que los niños estuvieron expuestos además de la exposición a los vapores de la gasolina y productos de la combustión de fósiles, a otros factores de contaminación en intramuros como son; el humo del cigarro, combustión de leña y materia orgánica.



**Gráfica 6.13.10. Modelo de caja de la frecuencia del Índice Mitótico en los diferentes Sitios de estudio. \*significativo  $p < 0.001$**

El Intercambio de Cromátides Hermanas permite determinar la proporción de las células que se han dividido una, dos o más veces durante un determinado período de

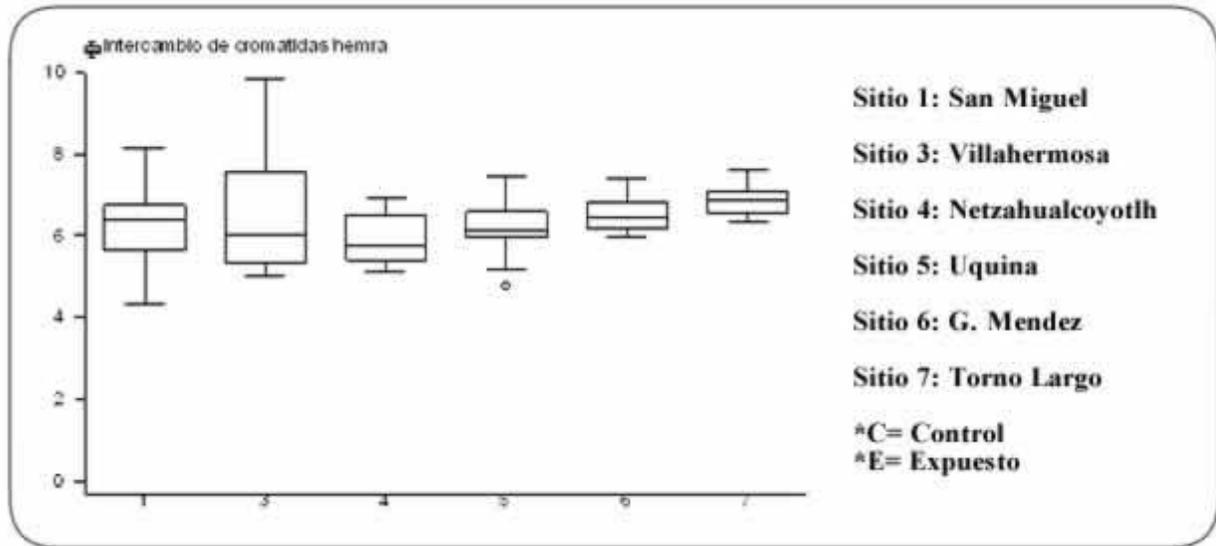
incubación y velocidad de proliferación. Los resultados de los cambios en los parámetros genotóxicos se expresan en: a) promedio de intercambios por célula y b) promedio de intercambios por cromosoma. En la figura 6.15.C, se presenta una Metafase en segunda división celular en donde se observa en la parte oscura del cromosoma los intercambios de cromátides:



**Fig. 6.15.C. Metafase en Segunda División Celular MII con ICH**

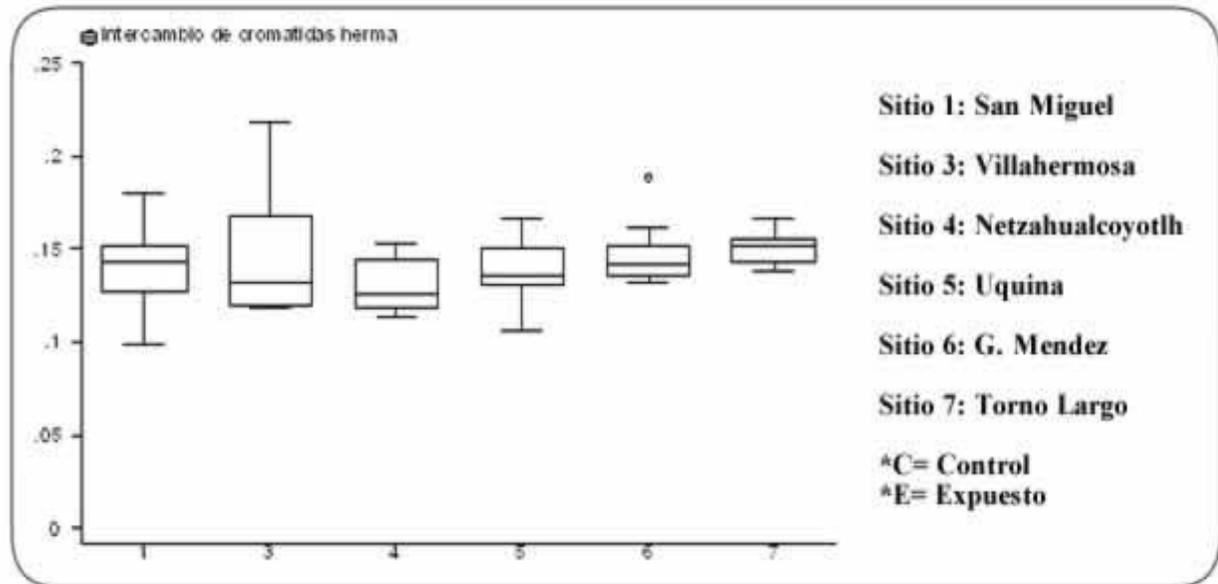
Las frecuencias de intercambios de cromátides hermanas por célula y por cromosoma fueron similares en ambos casos y no tuvieron diferencias significativas entre los diferentes sitios de estudio. Sin embargo, el sitio Torno Largo presentó el valor más alto de ICH.

El aumento encontrado en la frecuencia de ICH en los sitios Torno Largo, San Miguel y Gregorio Méndez, es probable que esté relacionado con la exposición crónica a gases emitidos por los quemadores elevados, calderas, motores de combustión interna y motocompresoras lo que origina emisiones a la atmósfera de partículas e hidrocarburos no quemados.



**Gráfica 6.13.11. Modelo de caja para la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas por célula.**

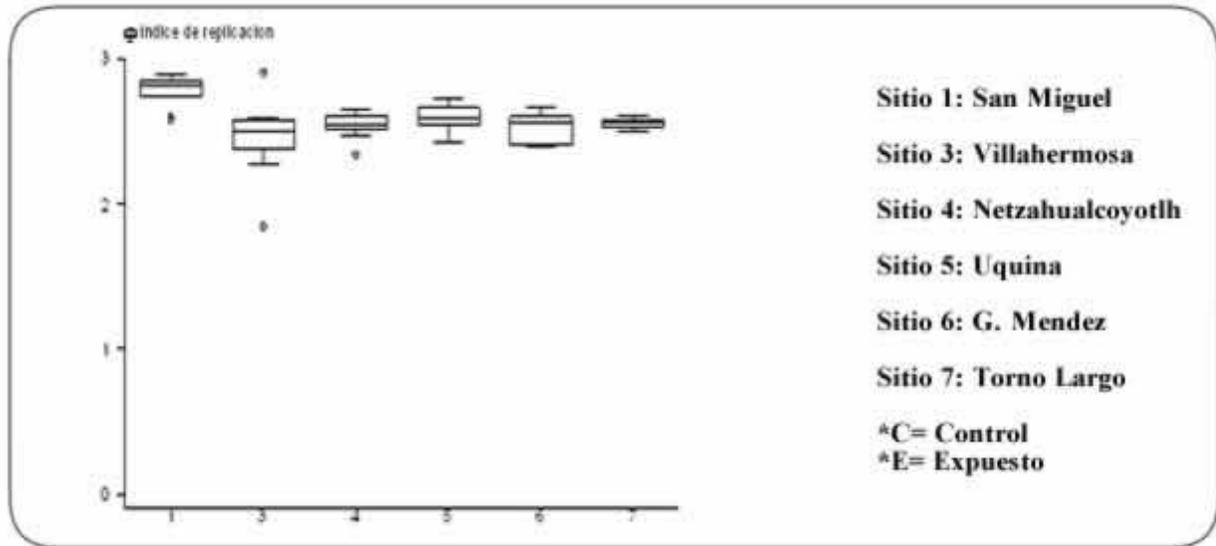
De acuerdo a Karahalil y colaboradores (1998), el trabajo realizado en Turquía, que consistió en analizar las frecuencias de ICH en jóvenes mecánicos expuestos a HPA's, mostraron resultados significativos en relación a la exposición, cuyos valores oscilaban entre  $4.47 \pm 0.09$  y  $4.06 \pm 0.16$  ( $p < 0.05$ ). A pesar de que esta investigación fue realizada en trabajadores con exposición directa por inhalación, así como por vía cutánea, se puede comparar con el presente estudio, ya que los individuos estuvieron expuestos a varias mezclas de hidrocarburos presentes en los vapores de la gasolina, como lo estuvieron los individuos de estudio a las emisiones producidas por motores de combustión interna. Como es el caso de la población de Nvo. Torno Largo expuesta a los gases emitidos por los quemadores elevados de la TMDB (Guzmán, 1998).



**Gráfica 6.13.12. Modelo de caja con las frecuencias de Intercambios por cromosomas.**

En la siguiente gráfica se aprecia el Índice de Replicación de los diferentes sitios de estudio, los cuales mostraron diferencias significativas entre los grupos. El IR permite determinar la velocidad de proliferación celular, ya que cuantifica la proporción de células que se han dividido una, dos o más veces durante el cultivo (Ostrosky *et al*,1988; Rojas *et al.*, 1993).

Comparando los resultados con estudios realizados por autores como Anderson y colaboradores en 1996, con el fin de describir el perfil de las exposiciones humanas ocupacionalmente expuestas a benceno y componentes del petróleo; analizaron la frecuencia de indicadores tempranos de daño genético en trabajadores adultos expuestos a emisiones de HPA's procedentes de plantas de petróleo inglesas, los resultados estadísticos en relación al IR no fueron significativos ( $p < 0.05$ ), con respecto a los controles, mostrando valores de  $IR_{\text{individuos expuestos}} = 2.28$  y un  $IR_{\text{individuos control}} = 2.34$ . Valores muy parecidos a los obtenidos en el estudio.



Gráfica 6.13.13 Modelo de caja para el Índice de Replicación de los diferentes sitios.

El daño al ADN evaluado como migración del ADN (Longitud de la cola del cometa) fue medido en micras, así como en unidades de longitud del núcleo (Cola/ Cabeza) en 50 células. Se utilizò el ensayo cometa alcalino que permite cuantificar rompimientos de la doble cadena que se manifestaron en una mayor migración del ADN nuclear hacia el cátodo. Los cometas tienen la apariencia de un cometa con una cabeza altamente fluorescente y una cola con longitud e intensidad de fluorescencia relacionada con el número de rompimientos inducidos por los agentes genotóxicos (Rojas, 1999).

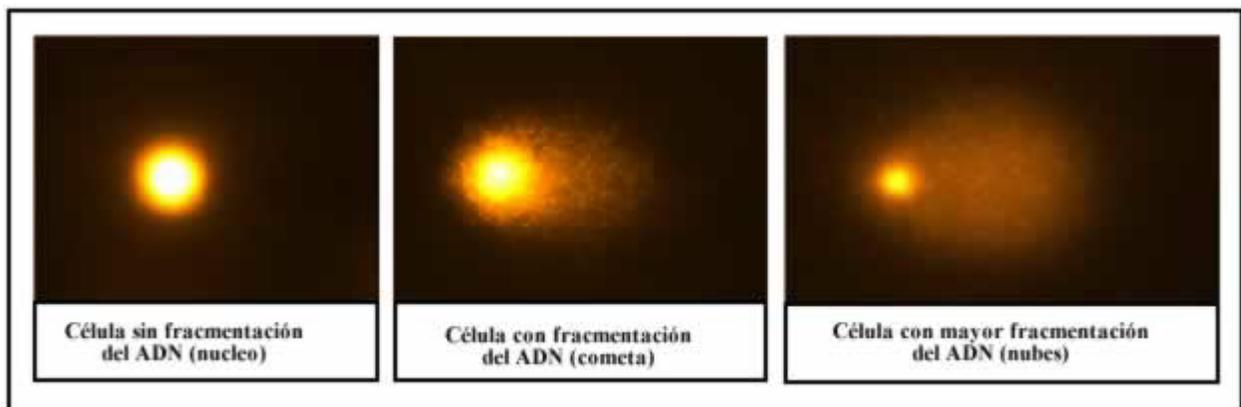
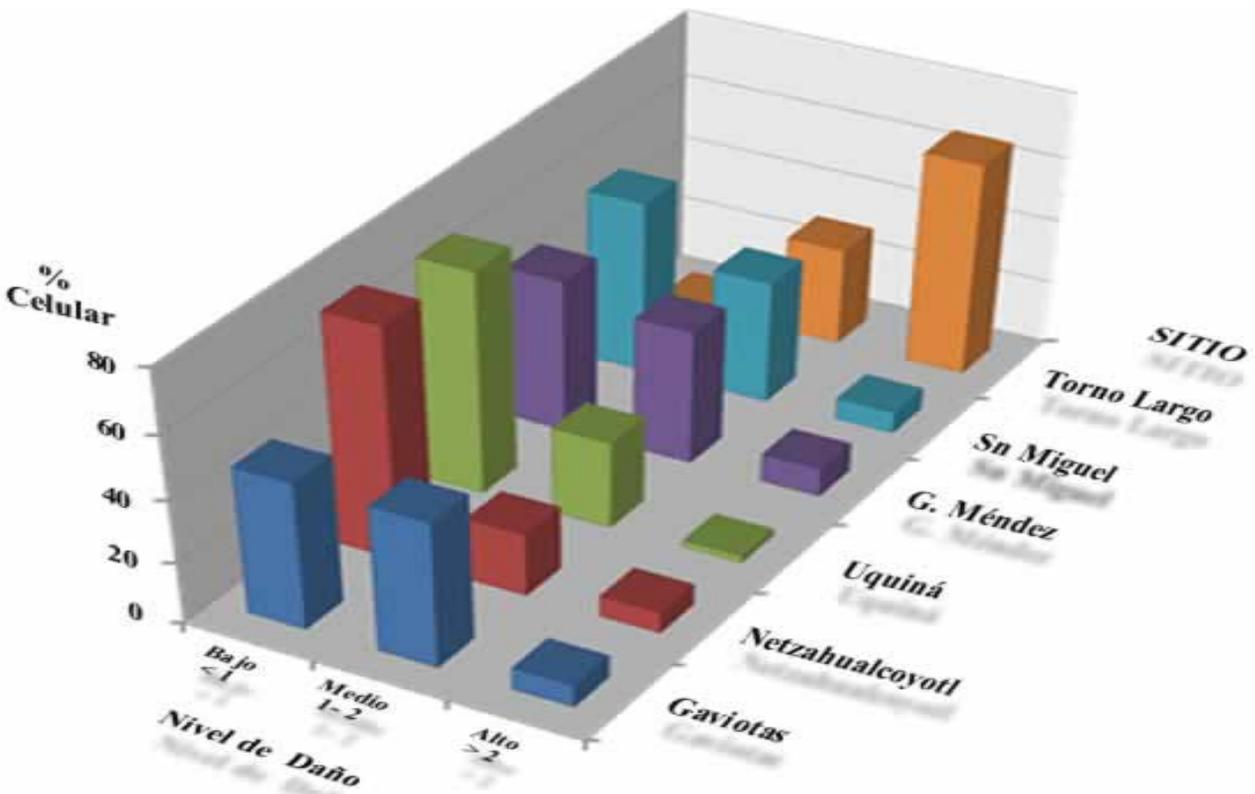


Figura No.6.15.D. Células de linfocitos con diferente grado de daño (Fragmentación del ADN)

En el presente estudio se aplicaron criterios de estimación de daño a través de la categorización de las células de acuerdo al valor del “radio cola/cabeza”, donde: ( $r \leq 1$  se consideraba bajo,  $r \leq 2$  medio y  $r > 2$  alto grado de daño). En la figura se muestra el porcentaje de células dañadas y el grado de daño en relación a cada sitio de estudio.

Los seis sitios analizados presentaron niveles de daño genotóxico de moderado a alto (longitud de la cola: 14.21 a 42.14  $\mu\text{m}$  y relación cola/cabeza: 0.97 a 2.83  $\mu\text{m}$ ) comparados con el grupo testigo (12.25 y 0.63 respectivamente). El grupo con mayor daño mostró una mayor proporción de individuos con células dañadas que el resto de los grupos (Torno Largo), como se observa en la siguiente gráfica.

Los grupos que presentaron los valores más bajos fueron los sitios Netzahualcóyotl y Uquiná (controles), como se observa en el siguiente gráfico.



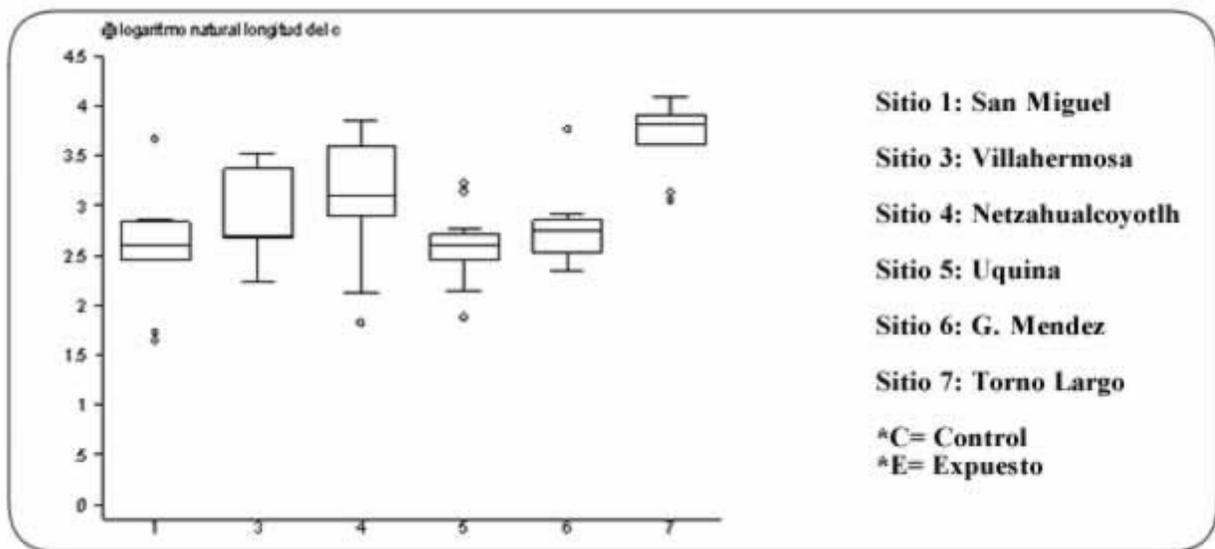
**Gráfica 6.13. 14.** Daño genotóxico al ADN de la población de estudio. El eje vertical representa la fracción de las células de los sujetos con daño genotóxico. El eje horizontal representa los 3 niveles del daño genotóxico de acuerdo a los valores del radio Cola/Cabeza. El eje de la z representa los sitios de estudio.

Los resultados mostraron un nivel de daño genotóxico diferente en los grupos que viven en las regiones con actividad petrolera y sugiere un riesgo potencial a la salud para estos grupos de la población.

El sitio Torno Largo con actividad petrolera presentó el daño mayor en el ADN en relación a la longitud de la cola del cometa, debido a que la población se encuentra expuesta crónicamente a los gases emitidos por los quemadores elevados, calderas, motores de combustión interna y motocompresoras, que contienen compuestos además de los HPA's, dióxido de azufre, NOx, CO, partículas, hidrocarburos no quemados, etc, como ya se ha mencionado anteriormente.

Este hecho es importante, debido a que las emisiones de los contaminantes generados por la Terminal, no permanecen dentro del área de trabajo sino que son emitidos a la atmósfera, donde ocurren las principales reacciones.

La siguiente gráfica muestra el efecto genotóxico medido en términos de longitud de la cola del cometa o migración del ADN y relación cola/cabeza del cometa, en donde se observan diferencias significativas entre todos los sitios, encontrando los valores más altos en el sitio No. 7 (Torno Largo):



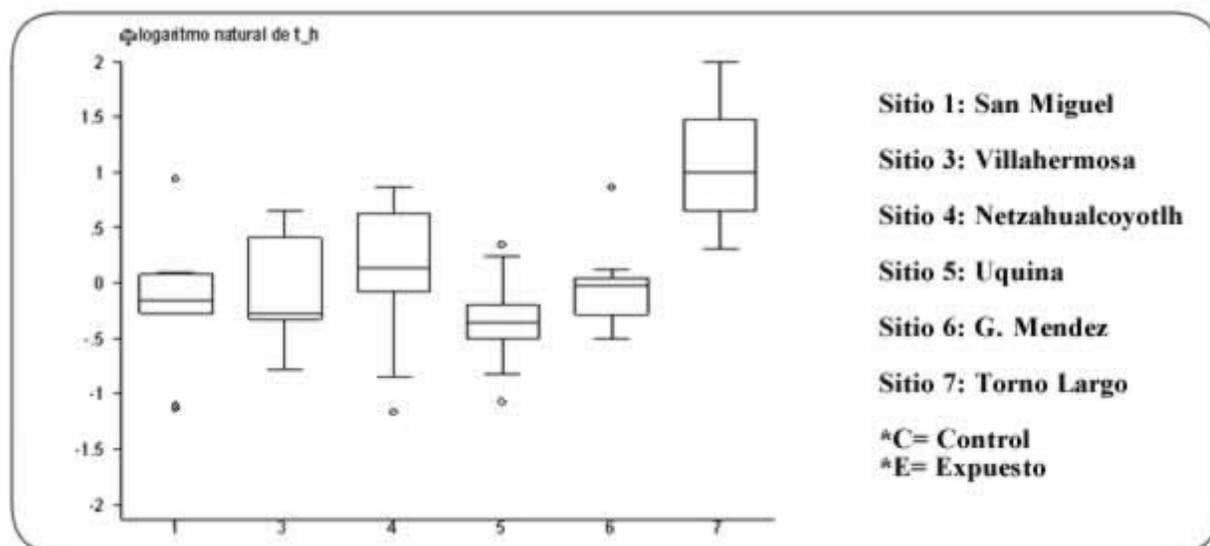
Gráfica 6.13.15 Modelo de caja para la longitud de la cola del cometa

Cabe señalar, que en las poblaciones expuestas (con actividad petrolera), el sitio Nvo. Torno Largo, presentó el mayor daño al ADN medido por el ensayo cometa e ICH por célula y por cromosoma.

Es posible que la combinación de exposición a hidrocarburos con otros agentes que dañan el ADN, contenidos en las mezclas complejas de petróleo, pueden presentar diversas interacciones y producir daño genotóxico. Así mismo, pueden desencadenar efectos metabólicos combinados entre diferentes sustancias tales como adiciones, antagonismos, sinergismos, etc.

El hecho de considerar que los hidrocarburos son los principales compuestos implicados en la generación de rompimientos de las cadenas sencillas del ADN, está basado en la estructura química general de los productos que se manejan en las instalaciones petroleras implicadas en el estudio: petróleo crudo y gas natural.

Por consiguiente, el incremento significativo en el daño al ADN, no puede ser atribuido a un solo contaminante, ya que el resultado puede verse afectado por la suma de factores tales como interacciones entre compuestos, tamaño de la muestra, deficiencias nutricionales, genotipo y exposiciones temporales a sustancias tales como pesticidas (Rupa *et al.*, 1989):



**Gráfica 6.13.16. Modelo de caja para la relación cola/cabeza del cometa.**

En la Tabla No. 6.19, se observa la comparación de los valores que mostraron los biomarcadores analizados en linfocitos de sangre periférica de poblaciones infantiles expuestas y no expuestas (grupo control) a HPA's. La mayoría de los parámetros tuvieron valores más altos en el grupo de los expuestos con respecto a los que no estuvieron expuestos (grupo control), sin embargo solo hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de ICH por cromosoma y por célula, así como en la variable cola/cabeza del cometa.

**TABLA 6.19. Comparación de los biomarcadores entre los grupos de población infantil expuesta y no expuesta.**

Biomarcador	Expuestos mediana*	No expuestos mediana*	valor p** < 0.05
<b>Micronúcleos</b>			
Micronúcleos por células† (n=73)	2.999 (1, 5.99)	2.659 (1, 8.0)	0.5
Índice de división nuclear (n=72)	1.405 (1.21, 1.53)	1.395 (1.08, 1.51)	0.9
<b>Cinética de proliferación celular</b>			
Índice mitótico (n=71)	0.039 (0.02, 0.05)	0.04 (0.02, 0.05)	0.8
Índice de replicación (n=71)	2.585 (2.41, 2.84)	2.56 (2.41, 2.69)	0.3
Intercambios de cromátides por célula ((n=71)	<b>6.55</b> (5.77, 7.48)	6.02 (5.15, 7.34)	<b>0.01**</b>
Intercambios de cromátides por cromosoma (n=71)	<b>0.143</b> (0.129, 0.168)	0.133 (0.117, 0.163)	<b>0.009**</b>
<b>Cometa</b>			
Tamaño de cola en micras† (n=70)	17.243 (10.67, 49.49)	15.479 (8.51, 36.46)	0.3
Razón cola/cabeza (n=70)†	<b>1.049</b> (0.61, 3.98)	0.834 (0.43, 1.93)	<b>0.05**</b>

\*Mediana y percentiles 10 y 90.

\*\*Prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney).

†El cálculo se hizo con el logaritmo natural y posteriormente se sacó el exponencial.

En la Tabla No. 6.20, se observa la comparación de las medianas de los biomarcadores de acuerdo al tipo de combustible para cocinar. Se encontraron diferencias significativas entre la variables: combustible leña y el combustible gas en las frecuencias totales encontradas en MN ( $p < 0.03$ ), aplicando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, para establecer la magnitud de las diferencias entre las medianas de estas dos variables.

La frecuencia de Micronúcleos en los hogares que utilizan gas para cocinar fueron más altas, lo que manifiesta que la variable: “leña para cocinar” no tuvo influencia en el comportamiento de los biomarcadores y las causas de exposición se debieron probablemente a otras fuentes de emisión de los HPA's de origen petrogénico, como podrían ser los originados por combustión incompleta de fósiles.

**TABLA 6.20. Comparación de los biomarcadores (Medianas) con respecto a la variable: Tipo de combustible para cocinar.**

Biomarcador	Leña/ gas y leña mediana (10%, 90%)	Gas mediana (10%, 90%)	valor p* < 0.05
<b>Micronúcleos</b>			
Micro núcleos por células† (n=73)	2.82 (1, 5.00)	3.99 (1.25, 12.37)	0.03
Índice de división nuclear (n=72)	1.4 (1.22, 1.51)	1.41 (1.05, 1.60)	0.6
<b>Cinética de proliferación celular</b>			
Índice mitótico (n=71)	0.04 (0.02, 0.05)	0.03 (0.01, 0.05)	0.09
Índice de replicación (n=71)	2.57 (2.42, 2.74)	2.57 (2.14, 2.88)	0.9
Intercambios de cromátides por célula ((n=71)	6.40 (5.38, 7.12)	6.32 (4.80, 8.42)	0.8
Intercambios de cromátides por cromosoma (n=71)	0.14 (0.11, 0.15)	0.13 (0.11, 0.18)	0.7
<b>Cometa</b>			
Tamaño de cola en micras† (n=70)	16.65 (8.47, 45.49)	16.47 (11.09, 42.06)	0.7
Razón cola/cabeza† (n=70)	0.97 (0.43, 2.54)	0.93 (0.59, 2.59)	0.9

\*Comparación de medianas con suma de rangos de Wilcoxon. †El cálculo se obtuvo en log natural y después en exponencial.

Para evaluar la asociación entre los diferentes hidrocarburos así como otras variables de exposición con los biomarcadores, se realizó un análisis de regresión lineal simple y de regresión múltiple; cuando se manejaron de manera continua, se relacionaron las variables confusoras, con los valores de los diferentes hidrocarburos y la frecuencia de cada uno de los biomarcadores.

La construcción de los Modelos de regresión Múltiple, se incluyeron las variables que tuvieran relevancia desde el punto de vista biológico (se tomaron los criterios de Riesgo a la salud, según la OEHHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment) para HPA's, así como las variables que tuvieran un valor de  $p < 0.05$  en los análisis previos (análisis de regresión simple). Posteriormente se hizo un diagnóstico del Modelo a través de un análisis de residuales y estadísticas de influencia. Se compararon las  $R^2$  y la  $R^2$  ajustadas, en donde el valor que más se ajusta es cuando ambas "R<sup>2</sup>" son parecidas.

Los resultados de los análisis bivariados se muestran a continuación, en la Tabla 6.21 para cada uno de los biomarcadores en donde la correlación logarítmica presentó una distribución normal con una magnitud lineal entre los diferentes parámetros de la población de estudio y los hidrocarburos; la "presencia de alguna enfermedad viral" y los hidrocarburos benzo(a) antraceno, criseno, benzo, dibenzo (a, h) antraceno en relación a la frecuencia de micronúcleos, presentaron valores significativos de  $p < 0.05$ .

**TABLA 6.21. Relación significativa entre los factores de confusión y los biomarcadores.**

<i>Micro núcleos por célula</i>	obs.	coeficiente (IC95%)*	R <sup>2</sup>	valor p<0.05
Benzo(A)Antraceno	73	0.012 (0.001; 0.022)	0.0731	0.021**
Criseno	73	0.009 (0.002; 0.016)	0.1005	0.006**
Dibenzo(A,H)Antraceno	73	0.020(0.006; 0.034)	0.1073	0.005**
Ha tenido alguna enfermedad viral	73	0.564 (0.231-0.898)	0.1401	0.001**
<b>Índice mitótico</b>				
Índice de masa corporal	71	0.000 (0.000- 0 .001)	0.0824	0.015**
Población rural	71	0.013 (0.005- 0.020)	0.1563	0.001**
Estufa de leña o leña y gas	71	0.006 (0.000- 0.012)	0.0676	0.029**
Usa plaguicidas la madre	71	0.006 (0.001- 0.011)	0.0817	0.016**
Acenafteno	71	0.021 (0.012 – 0.030)	0.2349	0.001**
Fluoreno	71	0.017 (0.011- 0.024)	0.3180	0.001**

Antraceno	71	0.001 (0.000- 0.003)	0.0858	0.013**
Fluoranteno	71	0.000 (0.000- 0.001)	0.2425	0.001**
Pireno	71	0.002 (0.000- 0.003)	0.0884	0.012**
Indeno(1,2,3-C,D)Pireno	71	0.000(0.000- 0.000)	0.0984	0.008**
<b>Ensayo cometa; Relación cola/cabeza</b>				
Benzo(A)Antraceno	70	0.019(0.010-0.288)	0.1993	0.001**
Criseno	70	0.011 (0.004- 0.018)	0.1358	0.002**
Benzo(k)Fluoranteno	70	0.022 ( 0.010- 0.335)	0.1787	0.001**
Benzo(a)Pireno	70	0.076 (0.050- 0.103)	0.3273	0.001**
<b>Ensayo cometa: Longitud cola cometa</b>				
Benzo(A)Antraceno	70	0.012 (0.003- 0.021)	0.1087	0.005**
Criseno	70	0.006 (0.000- 0.013)	0.0631	0.036**
Benzo(K)Fluoranteno	70	0.013 (0.002- 0.024)	0.0863	0.014**
Benzo(A)Pireno	70	0.058 ( 0.032- 0.084)	0.2333	0.001**

\* Regresión lineal simple.

\*\*Estadísticamente significativa.

A partir de los resultados anteriores, se aplicó un análisis de regresión lineal múltiple; para verificar que los datos cumplieran con los requisitos necesarios para llevar a cabo “normalidad de los residuos” y “residuos estandarizados” independientes entre ellos y la homogeneidad de las varianzas. Para finalmente evaluar los efectos de la exposición de las variables confusoras sobre la frecuencia de cada “biomarcador” y los hidrocarburos analizados en el estudio; a través de la aplicación de un “Modelo Múltiple” que mejor se adaptara para cada uno de los biomarcadores, el cuál se muestra en la Tabla No. 6.22. Se seleccionaron solo los datos que resultaron con valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

La variable que resultó con relación significativa ( $p < 0.05$ ), en el modelo múltiple asociada a la frecuencia de MN fue el “uso de plaguicidas dentro de la casa”, presentando un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.323$  y una R ajustada = 0.283.

La literatura indica que los plaguicidas pueden actuar sinérgicamente con otros contaminantes, como los hidrocarburos (combustión de leña y materia orgánica) y causar efectos potenciados, por ejemplo, en un estudio realizado en niños de zonas rurales de Estados Unidos, se analizaron las posibles causas de exposición involuntaria a diversos

insecticidas dentro del hogar, ya que los compuestos tóxicos como los plaguicidas van adheridos a partículas suspendidas y son transportados a grandes distancias de su fuente de emisión, o adherirse a ropa ó calzado de las personas que se dedican a fumigar cultivos y de esta manera transportar los plaguicidas hasta el hogar, en donde los infantes a través de piel o por inhalación pueden estar en exposición crónica y manifestar posteriormente algún tipo de daño. Asimismo se observó, que factores como la exposición a la combustión de materia orgánica, incrementa la frecuencia de MN e ICH, en niños a plaguicidas (Nishioka *et al.*, 2001).

Los resultados estadísticos en la relación *cola/cabeza (ensayo cometa) con los hidrocarburos* de la población de estudio, presentó una correlación estadísticamente significativa  $p < 0.05$ , con respecto a las variables; “Índice de masa corporal”, “antecedentes de cáncer en la familia y malformaciones congénitas”, presentaron valores significativos de  $p < 0.05$ .

Los hidrocarburos que presentaron diferencias significativas en relación a la longitud de la cola del cometa fueron: criseno, benzo (a) antraceno, benzo (k) fluoranteno y benzo (a) pireno. Existe una relación directamente proporcional entre estos hidrocarburos y la longitud de la cola del cometa, es decir al aumentar la concentración de los hidrocarburos aumenta la longitud de la cola del cometa.

El ensayo cometa, fue el biomarcador más sensible en comparación con los otros biomarcadores (Migliore, *etal* 2006).

**TABLA 6.22. Modelo Múltiple asociado a Biomarcadores**

Variable	Coficien.	Cof. Determ. R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustada	IC95%	Valor p<0.05
<b>Micronúcleos (n=73)</b>					
Uso de plaguicidas dentro de la casa	0.509			0.061-0.957	0.027
Constante	2.249	0.323	0.283	1.580 - 2.918	0.001
<b>Cinética de proliferación celular ( n=67)</b>					
Sexo (sexo)	0.103	0.027- 0.179			0.008
Antecedente familiar de malformaciones	0.133	0.024- 0.243			0.017
Constante	1.459	0.198	0.1466	1.298 - 1.620	0.001
<b>Índice de replicación (n=68)</b>					
dibenzo(a,h)antraceno	0.003			0.01- 0.006	0.001

Uso de plaguicidas dentro de la casa	0.081			0.012 - 0.150	0.021
Constante	2.611	0.478	0.4457	2.509 - 2.713	0.001
<b>ICH por célula(n=68)</b>					
Edad (edad)	0.072			0.003 - 0.14	0.060
Constante	7.357	0.231	0.1831		0.001
<b>Longitud de la Cola del Cometa (n=70)</b>					
Benzo(A)Antraceno	0.0344			0.023 - 0.045	0.000
Tabaquismo materno	0.7941			0.111 - 1.476	0.023
Número de veces que usó plaguicidas en los últimos 6 meses	0.0788			0.000 - 0.141	0.039
Constante	2.4987	0.403	0.3567		0.001
<b>Relación Cola/ Cabeza deCometa (n=70)</b>					
Índice de masa corporal	0.0343		0.0620	0.002- 0.066	0.038
Antecedentes de cáncer en la familia	0.5494		0.1411	0.221- 0.8774	0.001
Antecedentes de malformaciones en la familia	0.5280		0.0764	0.0839- 0.9721	0.021

Por otro lado se ha demostrado en estudios realizados sobre la incidencia de casos de cáncer de seno (Kalantzi y colaboradores, 2004), que existen factores moduladores implicados en la etiología del cáncer de seno. Se ha ligado la presencia de cáncer con la interacción de compuestos orgánicos persistentes (como algunos plaguicidas) con otros compuestos como los HPA's (Benzo (a) pireno, en granjeros y en dosis bajas de exposición como el Lindano, inducen MN y se asocian con la incidencia de cáncer de próstata y linfoma de Hodgkin. Esta relación de compuestos podría explicar probablemente las diferencias significativas encontradas en la frecuencia de MN con las variables confusoras: edad, índice de masa corporal y exposición a plaguicidas.

Analizando la relación entre las variables confusoras con la cinética de proliferación celular, el Modelo Múltiple que mejor se adaptó fue para las variables: "sexo" y "antecedentes de malformaciones en la familia" mostrando una relación significativa ( $p < 0.05$ ) y una  $R^2 = 0.19$ . Y para el índice de replicación, el hidrocarburo dibenzo (a,h) antraceno y "manejo de plaguicidas dentro de la casa", presentaron diferencias significativas, con una  $R^2 = 0.47$ .

El Modelo Múltiple que mejor se adaptó para el biomarcador intercambio de cromátides hermanas fue el asociado con la edad, mostrando una relación significativa ( $p < 0.05$ ) con una  $R^2 = 0.231$  y  $R^2$  ajustada = 0.183. Y las variables asociadas con la longitud de

la cola del cometa fueron: “tabaquismo materno” y “frecuencia en el número de veces que se utilizan los plaguicidas en los últimos 6 meses” asociados con el hidrocarburo benzo (a) antraceno, mostrando una relación significativa ( $p < 0.05$ ),  $R^2 = 0.4033$  y  $R^2$  ajustada = 0.3567.

En los estudios de biomonitorio, es fundamental la utilización conjunta de biomarcadores de exposición y de efecto, a fin de que la evaluación del riesgo genético sea más precisa. Se observa una gran variabilidad en los valores de las frecuencias de ICH, MN y ensayo Cometa, citados en la literatura, entre poblaciones, en diferentes estudios e incluso entre individuos (Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000). Existen factores que pueden contribuir de forma significativa a esta variabilidad, como pueden ser la influencia de los posibles factores de confusión.

Sin embargo, cabe destacar que los resultados obtenidos en nuestro estudio son bastante fiables debido al tamaño de la muestra y a los protocolos del ensayo estandarizados de acuerdo con la literatura. Además de que se tomaron en consideración los posibles factores de confusión que podrían modular la frecuencia de ICH, MN y ensayo cometa, tales como exposición a plaguicidas, tipo de combustible para cocinar (leña/gas), edad, dieta entre otros.

Los análisis multivariados mostraron que los factores de confusión en los resultados, contribuyen a la relación positiva entre algunas variables como son estilos de vida y hábitos; con cada biomarcador e HPA's. y otros con una relación negativa.

En el apéndice “M” de los anexos, se presenta la síntesis de los factores asociados a la genotoxicidad ( $p < 0.05$ ) encontrada en el estudio, en donde la mayoría de las diferencias significativas, entre los biomarcadores; Índice Mitótico, Frecuencia de Micronúcleos y la longitud de la cola del Cometa se relacionaron con los HPA's, antecedentes antropométricos y clínicos de la población. Y fueron los biomarcadores más sensibles por exposición a HPA's. Algunos de los parámetros antropométricos significativos se relacionaron con los estilos de vida como por ejemplo; “el tipo de combustible para cocinar”, “enfermedades virales”, “uso de plaguicidas en la casa”, etc.

El Índice Mitótico se relacionó esencialmente con las variables; “índice de masa corporal”, “predominio de población rural” y “población que utiliza leña para cocinar” y “maneja plaguicidas en el hogar”; los hidrocarburos asociados fueron acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno, pireno e indeno (1,2,3-C.D) pireno.

Uno de los biomarcadores sensibles como el ensayo cometa mostró diferencias significativas en relación a los hidrocarburos como el benzo (a) antraceno, criseno, benzo (k)fluoranteno, benzo (a) pyreno, benzo (k) fluoranteno; asociados con el “tabaquismo de la madre”, “manejo de plaguicidas”, “antecedentes de cáncer en la familia”, “uso de plaguicidas por el padre” y “la distancia de la población a una instalación petrolera”.

El modelo de análisis multivariado no paramétrico, para el caso de la relación cometa-hidrocarburo, refleja el efecto de las actividades petroleras en el ADN y sugiere que el daño observado se debe a la acción de los hidrocarburos atmosféricos presentes en los sitios de estudio.

Los resultados de los ensayos cometa y micronúcleos, revelaron que son biomarcadores muy sensibles para detectar daño en el ADN. Este hecho sugiere que pequeños incrementos en los parámetros medidos pueden servir como indicadores biológicos sensibles a niveles bajos por exposición a hidrocarburos, además de que representan la fragmentación del ADN, así como la formación de lesiones premutacionales, que pueden o no ser reparadas posteriormente. La relación entre ambos biomarcadores, soporta la razón de que el incremento basal en el daño al ADN, puede ser detectado sucesivamente en ambos biomarcadores. (Migliore, *et al* 2006).

En el caso de la población de estudio Nvo. Torno Largo, puede presentar un sistema inmune disminuido, lo que aumenta el riesgo de contrare enfermedades infecto-contagiosas, disminuyendo la calidad de vida de la población. (Gonsebatt, 1996).

## **7 .- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

---

En Tabasco no hay registros relacionados con exposiciones ambientales a hidrocarburos en poblaciones infantiles del Estado de Tabasco.

El presente estudio es uno de los escasos informes disponibles sobre HPA's en la atmósfera de Tabasco, México y el primero en relacionar los niveles genotóxicos y citotóxicos encontrados en poblaciones infantiles expuestas crónicamente a HPA's en la atmósfera de la región.

La alta variabilidad de las concentraciones de HPA's encontradas en el estudio, se asocian con la inestabilidad de los parámetros meteorológicos ya que variaron día a día, reflejando diversos orígenes de las masas de aire y la contribución de diversas fuentes de emisión. Por otro lado, algunos HPA's son fotoreactivos y sus velocidades de reacción dependen de la radiación del sol, de la temperatura ambiente y de algunos otros factores meteorológicos.

En la atmósfera de la región de Tabasco están presentes la mayoría de los 16 HPA's que la EPA establece como contaminantes prioritarios para el riesgo a la salud. La combustión incompleta de hidrocarburos de origen petroquímico y pirogènico son las fuentes principales de los HPA's encontrados en la atmósfera del estado de Tabasco. Las concentraciones de HPA's registradas fueron mayores en las regiones con actividad extractiva de petróleo, comparadas con las regiones con ausencia de esta actividad.

México no cuenta con una Norma Oficial Mexicana, para determinar los límites máximos permisibles de HPA's en el aire y solamente a la fecha se cuenta con un marco normativo que se relaciona con el impacto en suelos de sitios contaminados por derrame de hidrocarburos y sus derivados, en áreas urbanas, rurales e industriales. (NOM-EM-138-ECOL-2002)

Aunque no existen límites máximos permisibles establecidos en México para ser aplicados a concentraciones de HPA's en el aire, el presente estudio indica que la salud de las

poblaciones humanas que viven en las regiones donde las concentraciones del HPA's fueron elevadas, está en riesgo debido al hecho de que tienen una exposición crónica a dosis ambientales altas de HPA's. Los resultados analizados en el ADN muestran diferentes grados de daño genotóxico en los grupos de estudio, siendo mayor en los grupos que viven en las regiones con actividad petrolera, lo que sugiere un riesgo por el daño a la salud para estos grupos de la población.

Tomando en consideración las evidencias disponibles, sobre los estudios epidemiológicos, datos experimentales y la presencia de sustancias carcinogénicas, mutagénicas y genotóxicas en la atmósfera; se puede concluir que los productos de los combustibles fósiles, han sido responsables en las últimas décadas, del incremento en los casos de cáncer.

Una vez establecido el cáncer, resulta de alto costo su tratamiento y el porcentaje en el pronóstico puede ser fatal. Es indispensable reforzar los sistemas de vigilancia epidemiológica que permitan desarrollar y adoptar los métodos más eficaces para la prevención, detección temprana y tratamiento oportuno, para de esta manera aumentar la sobrevivencia y calidad de vida. Actualmente la identificación de los factores de riesgo es la estrategia más efectiva para reducir el cáncer. Es muy complejo curar un cáncer, es más sencillo prevenirlo.

Los factores que pueden modificar el efecto de un carcinógeno son multifactoriales; entre los más importantes podemos mencionar los que controlan el transporte, localización, activación e inactivación metabólica del carcinógeno en el organismo y que por lo tanto influyen sobre la dosis biológicamente activa que llega hasta el órgano blanco. Un factor adicional es la interacción de otros contaminantes como por ejemplo, los productos secundarios que se forman en la combinación de HPA's con gases como el dióxido de nitrógeno y dióxido de azufre con la susceptibilidad individual (Tokiwa, 1981).

Por lo anterior son necesarios estudios que ayuden a definir cuál es el efecto que tienen los carcinógenos presentes tanto en una atmósfera urbana como rural sobre las poblaciones expuestas. También se requiere de un mayor número de estudios de cohorte, casos y controles, con datos individuales sobre el consumo de tabaco, alcohol, dieta, ocupación,

lugar de residencia, exposición a contaminantes intra y extramuros, así como de los factores socioeconómicos que contribuyan al impacto en la salud, en particular sobre la incidencia de cáncer en el estado de Tabasco, ocasionado por hidrocarburos de la atmósfera. Ya que la población tabasqueña tanto rural como urbana se encuentra influenciada además de los factores de contaminación por hidrocarburos de origen petrogénico, por factores pirogénicos, relacionados con el estilo de vida; como el tabaquismo, exposición al humo de leña y otros biomateriales, especialmente en las poblaciones, donde se practica frecuentemente la técnica de roza-tumba y quema.

El monitoreo biológico por exposición a HPA's es una aplicación científica y técnica para prevenir de manera temprana el daño a la salud de las poblaciones en riesgo. Debe ser considerado, como complemento del monitoreo ambiental.

Considerando que los parámetros evaluados en este estudio; son biomarcadores reconocidos para evaluar la exposición a sustancias genotóxicas y mutagénicas, podemos inferir que las diferencias significativas presentadas entre los grupos de población expuesta y control a HPA's, se relacionan con los casos de leucemia infantil reportados por Cortès en 1994 en las regiones con influencia petrolera, lo cual indica que la población está en riesgo por estar expuesta crónicamente a los hidrocarburos.

Existe la necesidad de realizar más estudios en el estado de Tabasco, para determinar la sustancias y sus productos de degradación y reacción en la atmósfera, además de evaluar las dosis internas de las poblaciones infantiles expuestas a HPA's de regiones específicas, aunque la literatura, ya tiene identificados niveles de riesgo (EPA, 1986b), es necesario complementar los resultados con los biomarcadores de daño temprano; la aplicación de marcadores moleculares como son la prueba de FISH, aductos en el ADN, etc., que permitan relacionar los posibles riesgos de contraer cáncer en la población expuesta.

## **8 .- BIBLIOGRAFIA**

---

**Albertini R.J.** Nicklas J.A., O'Neil J.P. (1996). Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ health Perspect* 104 Suppl 3: 503-510.

**Albers P.H.** (1995). *Handbook of Ecotoxicology*, Lewis Publishers, 330-355.

**Abdel-Fadil**, M.R., Palmer, C.G., Herema, N. (1982). Effect of Temperature variation on sister chromatid exchange and cell cycle duration in cultured human lymphocyte. *Mut Res* 104: 263-267.

**Anderson, D.**, Hughes, J.A., Cebulska-Wasilewska A., (1996). Biological monitoring of workers exposed to emissions from petroleum plants. *Environmental Health Perspectives*. 104(3): 609-613.

**ATSDR.** (1989). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services: Toxicological profile for benzene. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR/TP-88/03.

**ATSDR,** (1995). Agency for Toxic Substances & Disease Register. ToxFAQs for PAHs. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Research Triangle Institute, N.C. Contract 205; 93-0606.

**ATSDR,** (1996). Agency for Toxic Substances & Disease Register. ToxFAQs for PAHs. <http://www.atsdr.cdc.gov>.

**Au, W.W.,** Cajas-Salazar., Salama, S. (1988). Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mut Res.* 400: 467-478 p.

**Awata H.,** Bates S., Knaub D. and Popelka R., (1998). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Properties and Environmental Fate An EXAMS Model Simulation. University CLEMSON, Environ Engine and Science, 40 p.

**Baird, C.** (2001). *Química Ambiental*. Ed. Revertè, Barcelona, España. 607 pp.

**Barale, R.(a)**. Giromini, L.; Ghelardini, G.; Scapoli, C.; Loprieno, N. ; Pala, M. ; Valerio, F. ; and Barrai, I. (1991). Correlations between 15 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and the mutagenicity of the total PAH fraction in ambient air particles in la Spezia (Italy). *Mutat Res*, 249: 227-241.

**Barale R (b)**, Chelotti L, Davini T. Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. (1998), sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen.* 31(3):228-42.

**Beltràn J.E.** (1988). Petróleo y Desarrollo, la política petrolera en Tabasco, México, Gobierno del Estado de Tabasco, 172 pp.

**Betancourt, M.** Ortíz, R., González, C., Pérez, P., Cortés, L. Rodríguez, L., Villaseñor, L. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mut Res* 331: 65-77.

**Bianchi, O.N.** (1978). Duplicación cromosómica y heterocromática a nivel molecular y citológico. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 48 pp.

**Binková, B.**, Lewtas, J., Misková, I., Rössner, P., Cerná, M., Mrácková, G., Perterková, K., Mumford, J., Meyer, S. and Srám R. (1996). Biomarkers studies in Northern Bohemia. *Environmental health Perspectives*, 104 suppl 3: 591-597.

**Bloemen L.J.**, Youk A., Bradley T.D., Bodner K.M., Marsh, G.(2004). Lymphohaematopoeitic cancer risk among chemical workers exposed to benzene. *Occup Environ Med.* 61: 270-274.

**Bocskay KA**, Tang D, Orjuela MA, Liu X, Warburton DP, Perera FP. 2005. Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:506-511.

**Bonassi, S.**, Fenech, M. Lando C., Lin Y.P., Ceppi M. Chang W.P.(2001). HUMAN MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Environ. Mol Mutagen* 37:31 - 45.

**Bonassi S.**, Au W.W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res.* 511: 73-86.

**Bonassi S.**, Znaor A., Ceppi M., Lando C., Wushou P. Ch., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Sadayuki B., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M.R., Zijno A., Norppa H., Fenech M.(2007), An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28(3):625-631.

**Botello, A.V.**, Díaz G.,(1991). Pollution by petroleum hydrocarbons in sediments from the continental shelf of Tabasco state, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47:565-571.

**Botello, A.V.**, Ponce, V.G. and Macko, S.A. (1996). Levels of Hydrocarbons Concentrations in the Gulf of México, Pollution and Environmental Impact; EPOMEX, Scientific Series, Number 5; University Autonomous of Campeche. México 666 p.

**Botello, A.V.**, (2005). Catacteristicas, Composición y Propiedades fisicoquímicas del petróleo. P 261-268. In A.V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold Bouchot y C. Argaz-Hernández (Eds). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da. Edición. Univ. Auton. De Campeche. Univ. Nal Auton de Mexico, Instituto de ecología 696 p.

**Bôstrom C. E.** and Gerde P.Hanberg A.(2002), Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. Environmental health perspectives; 110 suppl 3: 451-388.

**Bjorseth, A.** & Ramdahl, T. (1985). Sources and emissions of PAH. In: Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. Bjorseth, A. Ramdahl, T. (Eds). 2: 1-20 pp. M. Dekker, New York.

**Brender, J.D.** (2008). Residential proximity to waste sites and industrial facilities and chromosomal anomalies in offspring. Journal of Hygiene and Environmental Health. Volume 211, Issues 1-2, 12:50-58.

**Brusick, D.**,(1987). Principles of genetic toxicology. Plenum Press, USA. 284 p.

**Bucheli T. D.**, F.Blum, A. Desauls & Ö. Gustafsson. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere*. 56: 1061-1076.

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

**Carrano, A.V.** and Natarajan, A.T. (1988).Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mut. Res.* 204: 379-406.

**Cel'ik.,A.**, Akba,E.(2005).Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 :106-112.

**Chunlong Z, Z.** Gabriel, H. Gregory, and L. George. (2003).Potential PAH release from contaminated sediment in Galveston Bay-Houston Ship Channel. University of Houston-Clear Lake, Environmental Institute of Houston. Annual Report: 39-41.

**Climent, M.**; Torres, L.G.,(2007).Characterization and treatability of a contaminated soil from an oil exploration zone. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 4 (3): 311-322.

**Cruz V.L.**, (1993). Estudio "in vivo" sobre la validez del modelo replicativo de producción de intercambios en las cromátides hermanas. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 40 p.

**Climent, M.**, Torres, L.G.(2007). Characterization and treatability of a contaminated soil from an oil exploration zone. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4(3),: 311-322.

**Crawford F G**, Mayer J, Santella R M, Cooper T B, Ohman R, Tsai Wy. (1998); Biomarkers of Environmental tobacco smoke in preschool children and their mothers. *Journal National Cancer Institute* 86; 1398 – 402.

**Cortès, P.J.L.**(1994).La Leucemia infantil y la actividad petrolera en el Estado de Tabasco.Memorias XVII Congreso Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud. Instituto de Salud Pública de Cuernavaca.

**CIMADES.** (2003).Comisión Interinstitucional del Medio Ambiente para el Desarrollo Social. Evaluación de la Calidad del Aire; Poblado Nuevo Torno Largo, Municipio de Paraíso, Tabasco. Universidad Tecnológica de Tabasco, División de Tecnología Ambiental, 410 pp.

**Coutant R. W.**, Brown L. and Chuang J. C., (1988) Riggins R.M. Lewis R.G. Phase distribution and artifact formation in ambient air sampling for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Atmos Environ* 22;403-409.

**Daiker, D.H.**, Moslen M.T., Carr, J.B. and Ward. (1996).Repeated oral benzene exposure alters enzymes involved in benzene metabolism. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48: 439-451.

**Davis, C.S.**and Fellin,P. A. (1998). Review of Sampling Methods for Polyaromatic Hydrocarbons in Air. *Atmos. Environ.*: (46) 396.

**De Raat, W.K.**,(1983). Genotoxicity of aerosol extracts. Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations. *Mut Res.* 116: 47-63.

**Díaz-González, G.**, Cámara C., Botello, A.V., y Ponce, V.G., 1995. Evaluación de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en suelos hidromórficos de la reserva de la biosfera "Los Pantanos de centla" en Tabasco, México. *Revista Contaminación Ambiental* 12(1); 15-21.

**Díaz, G., R.** Gutiérrez, N. Pérez, S. Vega, A. Ramírez & G. Prad. (2001). Niveles de HAPs en cigarros consumidos por la población estudiantil de la UAM-X. En: Alfaro, F.H. (Ed), *Creatividad y quehacer científico en la UAM-Xochimilco.* 355 – 366.

**DGSA** (Dirección General de Salud Ambiental), (2002). Primer Diagnóstico Nacional de Salud Ambiental y Ocupacional. Comisión Federal para la protección contra riesgos sanitarios, Secretaría de Salud, México D.F.105 pp.

**EHC.**, (Environmental Health Criteria), (1998). No. 202, WHO, Geneva 365-382

**EPA.**, (U.S. Environmental Protection Agency).(1986<sub>b</sub> ). Guías para evaluar exposiciones. Parte VI (FRL-2984-4). United States Environmental Protection Agency.

**EPA.**, (US. Environmental Protection Agency). (1993). Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Criteria and Assessment Office. Cincinnati, OH. Final Draft. ECAO-CIN-842.

**EPA.**, (US.Environmental Protection Agency). (1997). Code of Federal Regulation, title 40, part 60, subparts D, Da, Db, Dc. Environmental Protection Agency: Washington, DC: 44 p.

**EPA** (U.S. Environmental Protection Agency). (1999). Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. Compendium Method TO-13A, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Center for Environmental Research. Information Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH 45268. EPA/625/ R96/010b.

**Elizondo, G.**, Montero, R., Herrera, J.E., Hong, E., Ostrosky- Wegman, P., (1994). Lymphocyte proliferation kinetics and sister- chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mut. Res.* 305: 133-137.

**Farmer P.B.**, Singh R, Kaur B, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Garte S.T., Gabelova E. A, Cebulska-Wasilewska A. (2003), Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, 544(2-3):397-402.

**Fairbairn, D.W.**, Olive, P.L., and O'Neill, K.L., (1995). The comet assay; a comprehensive review. *Mut. Res.* 329: 37-59.

**Fenech M.** and Morley A.A.(1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* Feb-Apr; 147 (1-2): 29-36.

**Fenech M.** (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 455:81-95.

**Fenech M.** (2003). Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMAN Micronucleus project.(HUMN project): detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* Jan 10; 534(1-2):45-64.

**Galicia Rosas G.**, (1998). Efecto citotòxico y genotòxico de compuestos orgánicos volátiles provenientes de la gasolina, en una población ocupacionalmente expuesta, Tesis Fac. Ciencias, UNAM.

**Garcia Enriqueta.**, (1964). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana, México 71 p.

**Grandi C.**, D'Ovidio M.C. y Tomao P., 2006. Use of the comet test in occupational medicine and industrial toxicology: considerations and prospects. *G. Ital Med Lav Ergon.* Jan-Mar;28(1):5-13

**Green, M.H.L.**, Lowe, J.E., Waugh, A. P.W., Aldridge, K.E., Cole, J. and Arlett, C.F. (1994). Effect of diet and vitamin "C" on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mut res* 316: 91-102.

**Gigliotti C. L.**, Fachs J. Nelson, D, Brunciak P.A. and Eisenreich J.S. (2000). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the New Jersey Coastal Atmosphere. *Environ. Sci. Technol* (34):266-275.

**Gebhart, E.** (1981). Sister Chromatid Exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genetics.* 58: 235-254.

**Gelboin, H.V.**, and Ts'o, P.O.P. (1988). Polycyclic Hydrocarbons and cancer. Academic Press Inc. New York, Vol 1.

**Gold-Bouchot, G.**, Zavala-Coral, M., Zapata, Pèrez, O. and Ceja-Moreno, V. (1997). Hydrocarbon Concentrations in Oysters (*Crassostrea virginica*), and Recent Sediments from three Coastal Lagoons in Tabasco, Mexico. *Bull. Environ Contam. Toxicol.* 59:430-437.

**Gómez-Cordero Carlos Manuel.** (2007). La explotación petrolera en el Municipio de Macuspana, Tabasco, 1949-1970. Tesis de Maestría en Ciencias Sociales, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 189 pp.

**Gonsebatt, M.E.**, (1994). Cinética de proliferación celular e intercambios de cromátides hermanas basales e inducidas por MMC en linfocitos humanos cultivados en solución salina balanceada suplementada con plasma autólogo", Tesis de Maestría, Fac. Ciencias UNAM., 1-44.

**Gonsebatt, M.E;** Herrera, L.A., Ostrosky-Wegman, P. (1995). Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. Label, mitotic and replication indices as biomarkers in environmental monitoring. Plenum Press. New York, 81-94.

**Gonsebatt, M.E.**, (1996). Marcadores biológicos de exposición a arsénico inorgánico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. División de Estudios de Posgrado, UNAM. 1-53.

**Gonsebatt, M.E.**, Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blas, J., del Razo, L.M., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M. and Ostrosky-Wegman, P. (1997). Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mut. Res.* 386: 219-228.

**Gouveia N.** y Fletcher T. (2000). Air pollution and daily mortality in Sao Paulo, Brazil; effects by cause, age and socioeconomic status. *J. Epidemiol. Commun. Health* 54: 750-755.

**Gulliver J.** y Briggs D.J., (2004). Personal exposure to particulate air pollution in transport microenvironments. *Atmospheric Environment* 38: 1-8.

**Guzmán C.A.** (1998). Diseño de una red automática de monitoreo atmosférico para la Terminal marítima de Dos Bocas, Tabasco, México. Tesis de Maestría Facultad de Ingeniería. División de estudios de Posgrado, UNAM 1-77.

**Hartmann, A.,** Plappert, U., Raddatz, K., Grûnert-Fuchs, M. and Speit, G. (1994). Does physical activity induce DNA damage, *Mutagenesis*; 9: 269-272.

**Hartwig A.** and Schewerdtle T., (2002) Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes; toxicological implications. *Toxicol. Lett* 127: 47-54.

**Herrera, L.A.,** Ramírez, T., Rodríguez, U., Corona, T., Sotelo, J., Lorenzo, M., Ramos, F., Verdorfer, I., Gebhart, E., Ostrosky-Wegman, P., (2000). Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer increased frequency of DNA damage in peripheral blood lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:1-5.

**Hininger I.,** Chollat-Namy A., Sauvaigo S., Osman M., Faure H., Cadet J., Favier A., Roussel A.M. (2004), Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat. Res.* 558:75-80.

**Hôgstedt, B.,** Holmèn, A., Karlsson, A., Raihle, G., Nillius, K. and Vestlund, K. (1991). Gasoline pump mechanics had increased frequencies and sizes of micronuclei in Lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mut Res.* 263: 51-55.

**Husgafvel-Pursiainen, K.** (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.*, 567: 427-474.

**IARC.** (International Agency for Research on Cancer). (1987). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: an updating of IARC monographs. World Health Organization. Lyon, France. Vol 1-42, *supplement* 7:252-254.

**IARC.** (International Agency for Research on Cancer). (2004). Tobacco smoking and tobacco smoke, IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Lyon, France, Vol 83.

**IARC.** (International Agency for Research on Cancer), (2008). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: an updating of IARC monographs. World Health Organization, Lyon France, Vol. 92, supplement 14:346.

**INEGI.** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1984). **Carta de Efectos Climatológicos Regionales. Noviembre-Abril,** Frontera E15-5, escala 1:250 000.

**INEGI.** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1984). **Carta de Efectos Climatológicos Regionales. Mayo-Octubre,** Frontera E15-5, escala 1: 250 000.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1984). **Carta de Efectos Climatológicos Regionales. Noviembre-Abril**, Villahermosa E15-8, escala 1: 250 000.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.. (1984). **Carta de Efectos Climatológicos Regionales. Mayo-Octubre**, Villahermosa E15-8, escala 1: 250 000.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1984). **Carta de Efectos Climatológicos Regionales. Mayo-Octubre**, Tenosique E15-9, escala 1: 250 000.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1984). **Carta de Efectos Climatológicos Regionales. Noviembre- Abril**, Tenosique E15-9, escala 1: 250 000.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1986) . **Carta Fisiográfica de Tabasco**, 2ª Ed. Esc 1: 1 000 000 SPP, México, D.F.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (1995). **Tabasco; Censo de Población y Vivienda**, Resultados Definitivos, Tabulados Básicos, 150 pp.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2000). **Anuario Estadístico de Tabasco**, México, D.F. 424 pp.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, (2001). **Cuaderno Estadístico Municipal, Balancán, Tabasco**, Gobierno del Estado de Tabasco. H. Ayuntamiento Constitucional de Balancán, 120 pp.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, (2001). **Cuaderno Estadístico Municipal, Comalcalco, Tabasco**, Gobierno del Estado de Tabasco. H. Ayuntamiento Constitucional de Comalcalco, 108 pp.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, (2001). **Cuaderno Estadístico Municipal, Paraíso, Tabasco**, Gobierno del Estado de Tabasco. H. Ayuntamiento Constitucional de Paraíso, 114 pp.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, (2001). **Cuaderno Estadístico Municipal, Centro, Tabasco**, Gobierno del Estado de Tabasco. H. Ayuntamiento Constitucional del Centro, 130 pp.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2001). **Cuaderno Estadístico Municipal, Reforma, Chiapas**, México, D.F. 119 pp.

**Jeffrey S. Ch., Selvin S., Metayer C., Crouse V., Golembesky and Buffler P.A.** (2006), Parental Smoking and the Risk of Childhood Leukemia. *American Journal of Epidemiology* 163(12):1091-1100.

**Kalantzi O.I.**, Hewitt R., Ford K., Alcock, R., Thomas, G., Morris J. Philips, D., Jones K. (2004). Inter-individual differences in the ability of human milk-fat extracts to enhance the genotoxic potential of the procarcinogen benzo (a)pyrene in MCF-7 breast cells., *Environ. Sci. Technol*, 38: 3614-3622.

**Karahalil, B.**, Burgaz, S., Fisek, G., Karakaya, A.E. (1998). Biological Monitoring of Young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops. *Mut. Res.* 412: 261-269.

**Kirsh- Volders, M.** (1997). Towards a validation of micronucleus test. *Mut. Res.* 392:1-4.

**Kyrtopoulous S A**, georgiadis P, Autrup H, Demopoulos N A, Farmer P, Haugen A, Katsouyani K, Lamert B, Ourebo S, Sram R, Stephanou G, Topinka J. (2001). Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution. Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate to low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: The AULIS project. *Mutat Res*; 496: 207-28.

**Kyrtopolous S.A.**(2006). Biomarkers in environmental carcinogenesis research: striving for a new momentum. *Toxicol. Lett.* 162: 3-15.

**Kopjar N**; Garaj-Vrhova., Application of alkaline asay comet in human biomonitoring for genotoxicity; a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis* (2001) Vol 16 No. 1 pp71-78.

**Koss G.** and Tesseraux I. (1999). *Toxicology*, Marquardt H. et al Eds, Academic Press, San Diego, 603-644 pp.

**Lazcano- Ponce E.**, Sánchez-Zamorano L.M., Benowitz N., 2007. Elevada concentración de cotinina en hijos de padres fumadores. *Salud pública de México*. Vol 49, suplemento 2 .

**Latt, S.A.** (1974). Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science.* 185: 74-76.

**Lee, R.**, Hung, H., Mackay, D. and Jones K.(1998). Measurement and Modeling of the Diurnal Atmospheric PCBs and PAHs. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2172-2179.

**Lemiere S.**, Cossu L., Bispo A., Jourdain M., Lanhers M., Burnel D. (2005), DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the Schwartz J. Erika oil-spill Air pollution and children's health. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* Volume 581, 7:11-21.

**Lewis, R.J.**, Schnatter A.R., Drummond I., Murray N., Thompson F.S., Katz A.M., Jorgensen G., Nicolich M.J., Dahlman D., Thèriault G, (2003). Mortality and Cancer morbidity in a cohort of Canadian petroleum workers. *Occup Environ Me* 60: 918-928.

**Lewtas, J.** (2007). Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive and cardiovascular effects. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Volume 636, Issues 1-3 :95-133.

**Lindbland, A., Lambert, B.** (1981). Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocyte cultures. *Hum Genet.* 57:31-34.

**Mackay D. y Callcott D.** (1998). Partitioning and physical chemical properties of PAH's, en : *The Handbook of environmental chemistry* (O. Hutzinger, Ed). Springer- Verlag, Berlin, Vol.3 parte 1 pp 325-346.

**Mckelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Scmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Mèo, M.P. and Collins A.** (1993). The Single Cell Gel electrophoresis Assay (comet assay); a European review. *Mut res* 288: 47-63.

**Madrigal-Bujaidar, E.; Díaz-Barriga, S.; Cassani, M.; Molina, D.; Ponce, G.** (1998). In vivo and in vitro induction of sister-chromatid exchanges by nordihydroguaiaretic acid. *Mut Res.* 412: 139-144.

**Maloni E. y Samara C.** (1994). Comparative study on the extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from urban atmospheric particulates by various techniques and solvents. *Fresenius Environ. Bull* 4; 74-79.

**Matsuchita H., Endo O., Goto S., Simizu H., Matsumoto H., Tamakawa K., Endo T., Sakabe Y., Tokiwa H y Ando M.** (1992). Collaborative study using the preincubation *Salmonella thyphimurium* mutation assay for airborne particulate matter in Japan. A trial to minimize interlaboratory variation. *Mutat Res.* 271;1-12.

**Mei Ru- Chen., Perng-Jy Tsai., Ying F., Wang W.** (2008). Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health risks for workers exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. *Environ. Int.* ( 2008), Volume 34: 309-436.

**Mastral A. M. and Callén M. S.,**(2000). A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Energy Generation. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3051-3057.

**Miller J.C. y Miller J.N.** (1993). *Statistics for analytical chemistry.* 3a. Ed., Ellis Horwood PTR, Prentice Hall, Nueva York, 233 p

**Mielzyńska D Siwińska E Kapka L Szyfter K Knudsen LE Merlo D.F.** (2006). The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis*, Sep; 21(5):295-304.

**Miel D.**, Siwiska E., Kapka L, Krzysztof Szyfter, Lisbeth E. Knudsen Domenico Franco Merlo D.,(2006). The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. European Concerted Action Children-Geno-Network (QLK4-CT-2002-02198).

**Migliore L.R.**,Colognato R., Naccarati, A., Bergamaschi.,E. (2006) Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study, *Mutagenesis* vol. 21 no. 2 pp. 149–152.

**Molina L.T.** y Molina M.J. (2002). Air quality in the Mexico Megacity: An integrated assessment. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht/Boston/London. 384 p.

**Montero R.**, Valencia, D., Moreno, P., Sandoval,M., Ostrosky-Wegman, P. (1989). Point mutation and cytogenetic analysis on lymphocytes from neurocysticercotic patients treated with paraziquantel. *Env Mol. Mut.* 14(15):132.

**Montero-Montoya,R.**, Serrano, G.L., Ostrosky-Wegman, P., (1997). In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker. *Mut. Res.* 391: 135-141 p.

**Motelay-M.A.**,Ollivonb D., Garbanb B. and Chevreuilb M. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk deposition at a suburban site: assessment by principal component analysis of the influence of meteorological parameters. *Atmospheric Environment*, 37: 3135–3146.

**Morales-Ramírez, P.**, Vallarino-Kelly, T., Rodríguez-Reyes, R.,(1984). *In vivo* persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environmental Mutagenesis*, 6: 529-537.

**Morley, N.**,Rapp, A.,Dittmar,H., Salter,L., Gould,D., Greulich, K.O., Curnow, A. (2006).UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrosis cells. *Mutagenesis*, vol 21 no .2. pp. 105-114.

**Mucci, L.A.**, Granath, F. and Cnattingius, S. (2004). Maternal smoking and childhood leukemia and lymphoma risk among Swedish children. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13:1528–33.

**Mutchinick, O;** Ruiz, L.; Casas, L.(1980). Time of first generation metaphases. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mut Res* 72: 127-134. Database report on federal, state, local air activities. Research Triangle Park, N.C., EPA. Office of Air Quality Planning and Standards (September).

**NCR**, National Research Council, (1992). Board on environmental studies and toxicology, subcommittee on immunotoxicology, comitte on biological markers, biological markers in immunotoxicology. National Research Council, Comissions on Life Sciences, National Academic Press, Washington, D.C. 68-71 p.

**Neri M**, Ceppi M, Knudsen L, Franco D, Barale R, Puntoni R, and Bonassi S . B.(2005). Baseline Micronuclei Frequency in Children: Estimates from Meta- and Pooled Analyses. *Environ Health Perspect.* September; 113(9): 1226–1229.

**Neri M.**, Ugolini D., Bonassi S., Fucic A., Holland N., Knudsen L.E., Rám R.J., Ceppi M., Bocchini V., Merlo D.F. (2006). Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat. Res.*, 612:14-18.

**Nisbet I.C.** y LaGoy P.K. (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 16, 290-300.

**Nishioka M.G.**(2001).Distribution of 2,4-D in air and on surfaces inside residences after lawn applications: comparing exposure estimates from various media for young Children. *Environmental Health Perspectives* Volume 109. Number 11.

**Noreña B.**, Gold B., Zapata P. and Sericano J. (1999). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in American Oysters (*Crassostrea virginica*) from Terminos Lagoon, Campeche, Mexico. *Mar. Poll. Bull.*: 38(8); 637-645.

**NRC.** National Research Council (1989). Biological markers in reproductive toxicology, National Research Council, Commission on Life Sciences, National Academic Press., Washington, D.C. 15-29 p

**NRC.** National Research Council (1992). Board on environmental studies and toxicology, subcommittee on immunotoxicology, National Research Council, Commission on Life Sciences, Academic Press, Washington, D.C. 68-71 pp.

**NOM-EM-138-ECOL-2002.** Norma Oficial Mexicana, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos. Diario Oficial de la Federación, 20 Agosto 2002, México, pp 43-54.

**Obe, G.**, Beek, B. y Dudun, G., (1975). The human leucocyte test system V. DNA. Synthesis and Mitosis in PHA-stimulated 3-day culture. *Humangenetik* 28:295-302.

**Olive, P.L.**, Wlodek, D., and Banath, J.P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research* 51: 4671-4676.

**Olive, P.L** and Banath J.P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin and etoposide. *Int. Journal Radiation Biology.* 64: 349-358.

**Offenberg. J.H.**, Baker-J.B., (1999). Aerosol Size Distributions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban and Over-Water Atmospheres, *Environ. Sci. Technol.*, 33 (19), pp 3324–3331

**OEHHA.** Office of Environmental Health Hazard Assessment. (1994). Benzo (a) pyrene as a toxic air contaminant, 16.

**Ortiz, R.**, Campos, C., Gómez, J.L., Espinoza, M., Ramos-Motilla, M., Betancourt, M. (1994). Sister Chromatid Exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition. *Mut. Res.* 312:33-37.

**Ostrosky-Weegman, P.**, Montero, R; Hernández, N; Ruiz, L; Gasque, L; Herrera, L; Ruiz M.; Cortinas N.; Rodríguez, C.R. (1988). Lymphocyte proliferation kinetics as a cytostatic screening system. *Env. Mol. Mutagen.* 11, Suppl. 11:80

**Ostrosky-Wegman, P.** y Gonsbatt, M.E. (1997). Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos xenobióticos. *Gaceta Médica de México* 133:93-96.

**Parke D.V.** (1996). Personal reflections on 50 years of study of benzene toxicology. *Environmental Health Perspectives* (suppl 6) 104: 1123-1128,

**Pang, D.**, McNally, R. and Birch, (2003). J. Parental smoking and childhood cancer: results from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Br. J. Cancer*, 88:373–81.

**Platt K.**, Aderhold S., Kulpe K., Fickler M., (2008). Unexpected DNA damage caused by Polynuclear Aromatic Hydrocarbons under standard laboratory conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 650:96-103.

**Perera, F.P.** (1996). Uncovering new clues to cancer risk. *Scientific American*,; 40-46 p.

**Perera, F.P.** (2008). Children Are Likely to Suffer Most from Our Fossil Fuel Addiction. *Environmental Health Perspectives*. Volume 116; Number 8, August; 987-990p.

**Pérez H.N.**; Ceballos Q.J.; Pinto E.D., (1999). Prevalencia de intercambios de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Rev. Biomed.* 10(2): 71-76.

**Perry P.** y Wolff, S. (1974). New Giemsa method for differential staining of sister chromatid. *Nature* (London) 251: 156-158.

**Plerola C.**, Zacarias D., Maria A., Pires C., Pool S., Lilian R. (2003). Measurements of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in airborne particles from the metropolitan area of Sao Paulo City, Brazil. *Atmospheric Environment*, 37:3009-3018.

**Pitarquè, M.**, Carbonell, E., Lapeña, N., Marsà, M., Valbuena, A., Creus, A., Marcos, R., (1997). SCE analysis in peripheral blood lymphocytes of a group of filling station attendants. *Mut. Res.* 390: 153-159.

**Pool-Zobel, B.L.** and Leucht, U. (1997). Benzo(a)pireno. *Mut Res* 375: 105-112.

**Ponce Vèlez, G.** y Botello V.A. (2005). Niveles de hidrocarburos en el Golfo de Mèxico p 269-298. In: A.V. Botello, J. Rendòn-Von Osten, G. Gold Bouchot y C. Agraz- Hernández (Eds). Golfo de Mèxico, Contaminaciòn e Impacto Ambiental: Diagnòstico y Tendencias, 2da. Ediciòn. Univ. Auton. De Campeche, Univ. Nal. Auton de Mèxico, Instituto Nacional de Ecologia, 696 p

**Ponciano R.G.** (1996). Càncer pulmonar y contaminaciòn atmosfèrica. Existe asociaciòn?.; Riesgos ambientales para la salud en la Ciudad de Mèxico (O.R. Serrano y R.G. Ponciano, Eds). Programa Universitario del medio Ambiente, UNAM, Mèxico D.F., 127-171 pp.

**Qing Lan.,** Mumford J.L., Shen Min., De Marini D.M. 2004. Oxidative damage-related genes *AKR1C3* and *OGG1* modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH- rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis* 25 (11): 2177-2181.

**Ramírez-Venegas A,** Sansores R.H, Pérez-Padilla R., Regalado J, Velázquez A, Sánchez C, Mayar M.E.(2006). Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Respir Crit Care Med.*;173(4):393-397.

**Ramos, R.H.** (2004). Aspectos històricos de la industria petrolera en Mèxico, Bol Trim, Villahermosa, PEMEX, año 11, número 29, Julio-Septiembre, 13 p.

**Rehwagen, M.,A.** Müller, L. Massolo, O. Herbarth & A. Ronco. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of the Total Environment.* 348: 199-210.

**Rodrìguez, R.A.**(1998). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos, La Ciencia, 95 p.

**Rojas, E.,** Herrera, L.A.; Sordo, M; Gonsebatt, M.E.; Montero, R.; Rodrìguez, R. Ostrosky-Wegman, (1993) P. Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. *Anti-Càncer Drugs.* 4: 637-640

**Rojas, E.,** López, M.C. and Valverde, M. (1999), Single Cell Gel Electrophoresis Assay: Methodology and Applications. *Journal of Chromatography, B:* 722:225-254.

**Ruan Q.,** Stacy L.G., Penning M.T., Harvey G.R., Blair I.A. (2007); Aldo-Keto Reductase and cytochrome p450- dependent formation of benzo (a) pyrene- derived DNA adducts in human bronchoalveolar cells *Chem.Res. Toxicol.*, 20(3), 424-4431.

**Ruchirawat M.,** Navasumrit P., Settachan D., Tuntaviroon J., Buthbumrung N., Sharma S. (2005), Measurement of genotoxic air pollutant exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 206: 207-217.

**Ruíz G.** y Rizo R.( 2007). Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer, Volume. 58,* Issue 2:184-190.

**Rupa D. S.**, Reddy P.P., Sremannarayana K., , Reddi O.S., Galloway S.M., (2006). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environmental and Molecular Mutagenesis* Volume 18 Issue 2, Pages 136 - 138.

**Salazar, A.M.**, Montero, R., Gonsebatt, M.E., Diaz-Barriga, F., Yàñez, L., Gòmez, H., Ostrosky-Wegman, P., (1996). Uso de marcadores biològicos en poblaciones expuestas a mezclas de sustancias químicas. *Riesgos Ambientales para la salud en la Ciudad de Mèxico*. Programa Universitario del Medio Ambiente, 198-206.

**Seoane A.I.**, Gùerci A.M., Dulout, F.N., (2000), Mechanisms involved in the induction of aneuploidy; significance of chromosome loss. *Genetics and Molecular Biology*, 23,4: 1077-1082.

**Seung S.** Parka, Y., Chang H. (2002), Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment* 36:2917-2924.

**Samsøe-Petersen, L.**, Larsen, E.H., Larsen, P.B., Bruun, P. (2002) Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils. *Environ Sci Technol*, 36(14): 3057-63

**Seung, S.;** Parka, Y., Chang, H. (2002). Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmos. Environ.*, 36: 2917-2924.

**Seinfeld J.H.** (1989). Urban air pollution. State of the science. *Science* 243,745-762.

**Singh, N.P.**, McCoy, M.T. Tice, R.R. and Schneider E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.

**Singh, N.P.**, Danner, D.B., Tice, R.R., Brant, L., and Sneider E.L.. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research* 237:123.130.

**Singh R.** (2007). The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat. Res.* 1, 620(1-2):83-92.

**Snyder, C.A.** y Valle, C.D.(1991). Lymphocyte proliferation assays as potential biomarkers for toxicant exposures. *J.Toxicol. Environ. Health.* 34: 127-139. E.

**Steliarova-Foucher, C.** Stiller, P. Kaatsch, F. Berrino, J.W. Coebergh, B. Lacour, M. Parkin, (2004). Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study, *Lancet* 364: 2097–2105.

**Straif, K.** e IARC Monograph Working Group.( 2006). Carcinogenicity of some indoor pollutants: emissions from household combustion of coal, household combustion of biomass fuel, and high-temperature frying. **Lancet Oncology**.

**Schulz, H. M.** & K. C. Emeis. (2000). Sources and pathways of natural and anthropogenic hydrocarbons into the natural dump Arkona Basin (southern Baltic Sea). *Environmental Geology*. 39(8): 839-848.

**Shimada T.**, Murayama, N., Tanaka, K., Takenaka, Sh., Imai, Y., Hopkins, N.E., Maryam K. F., Willam., Alworth, W.L., Yamazaki, H., F. Guengerich, P. Komori., M. (2008). Interaction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Human Cytochrome P450 1B1 in Inhibiting Catalytic Activity. *Chem. Res. Toxicol.* 40: 204-217.

**Shugart., L.R.**(2000) DNA Damage as a Biomarker of Exposure. *Ecotoxicology* 9, 329-340.

**Stolley, P.D.**, Soper, K.A., Galloway, S.M., Nichols, W.W., Norman, S.A., Wollman, S.R.,(1984). Sister Chromatid exchanges in association with occupational exposure to ethylene oxide. *Mut Res* 129: 89-102.

**Stromber H.L.**, Tinnerberg H., Mickoczy, Z, (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis.. *Int J Hyg Environ Health.*; 204(1):43-7

**Surrallès J.**, Xamena N., Creus A. Catalàn J., Norppa H., Marcos R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res* 341: 169-184.

**Tang D. Warburton D.**, Tannenbaum S.R, Skipper P., Santella R.M, Cerejido GS. (1999), Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. *Cancer epidemiology Biomarkers Prevention* 13 : 346-352.

**Tavadia, H.B.**, Fleming, K.A., Hume, P.D., Simpson, H.W.,(1975). Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-induced lymphocyte transformation. *Clin. Exp Immunol.* 22: 190-193.

**Tice, R.R.**, Strauss, G.H.S., Peters, W.P. (1992). High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*: 271; 261-271.

**Tice, R.R.** and Ivett, J.L.(1985). Cytogenetic analysis of bone marrow damage. *Toxicology of the blood and bone marrow.* New York, 119-129.

**Tice, R.R.**, Strauss, G.H.S., Peters, W.P. (1992). High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mut Res* 271: 261-271.

**Tice, R.R.**, Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.

**Tsai H T**, Wu M t, Hauser R, Rodríguez E, Ho C K, Liu CL. (2003); Exposure to environmental tobacco smoke and urinary 1-hydroxypyrene levels in preschool children. *Kaoshiung Journal Medicine Sciences*. 19: 97- 104.

**Tucker, J.D.**, Christensen, M.L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mut Res* 190: 225-228.

**Tucker, J.D.**; Preston, R.J. (1996). Chromosome aberrations , micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mut. Res.* 365: 147-159.

**Tuntawiroon. J.**, Mahidol. CH., Navasumrit. P., Autrup. H. and Ruchirawat. M., (2007), Increased health risk in Bangkok children exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from traffic-related sources. *Carcinogenesis* 28(4):816-822.

**Taylor, I.W.**, Hodson, P.J. (1994). Cell Cycle regulation by environmental pH., *J. Cell. Physiol.* 121: 517-525.

**Valverde- Ramírez, M.A.** (1997). Efectos genotòxicos por inhalación de plomo y cadmio en ratòn. Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomèdicas, UNAM, 65 p.

**Van Houdt J.J.**, Alink G.M. y Boleij J.S. (1987). Mutagenicity of airborne particles related to meteorological and air pollution parameters. *Sci. Total Environ.* 61: 23-36.

**Verma, D.K.** and Tombe, K. (2002). Benzene in gasoline and crude oil: occupational and environmental implications. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 63:225-230.

**Vives I.**, Grimal J.O. y Guitar Raimon. (2001). Los Hidrocarburos Policiclicos Aromáticos y la Salud Humana. Apuntes de Ciencia y Tecnología No.3, Septiembre, asociación para el avance de la Ciencia y Tecnología, (AACTE), Madrid, España. 45-51 p.

**Vineis P.** and Husgafvel-Pursiainen K. (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 26(11):1846-1855

**Wang T.S.**, Links J.M. Groopman J.D. (2001). Molecular Epidemiology and Biomarkers: Gen Toxicol. *Canc., WN Choy*, 271-298.

**Wania F.**, Haugen J.E., Ying D. Mackay D., (1998).Temperature Dependence of Atmospheric Concentrations of Semivolatile Organic Compounds. *Environ. Sci. Technol.* (32) 1013-1021.

**Weisburger, J.H.** and Williams, G. M. (1991). Chemical carcinogens, casarett and doull's toxicology: The basic Science of poisons. 4<sup>a</sup> ed.,M.O. Amdur, J. Doull y C.D. Klasassen, eds. Pergamon Press, Inc.,Elmsford, Nueva York, 131p

**Wen, W.N.,**Lieu, T.L. (1993). The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocyte cultured in vitro. *Mech. Ageing Rev.* 21:377.

**Wild S. R.** & K. C. Jones. (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution.* 88: 91-108.

**Wild, C.P.** and Kleijnans,J.(2003). Children and increased susceptibility to environmental carcinogenesis: evidence or empathy? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1384–1389.

**Wilson S.H.** and Suk W.A. (2002). Biomarkers of Environmentally Associated Disease; Technologies, Concepts and Perspectives. Lewis Publishers, Denver, Ma, USA. 582 pp.

**Wolff, S.,**Azfal, V.,Brown, L.P.,(1984). Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mut Res,* 129:207-213.

**Woodruff T.J.,** Caldwell J., Cogliano V.J. y Axelrad D.A. (2000). Estimating cancer risk from outdoor concentrations of hazardous air pollutants in 1990. *Environ Res.* 82: 194-206.

**Yunker M. B.,** Macdonald, R.W., Vingarzan, R. H. Mitchell, D. Goyette & S. Sylvestre. ( 2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry.* 33: 489-515.

**Zavala Cruz J.,** Ortíz C. A., Ojeda Trejo E. y Botello A. V. 1996, Contaminación del Suelo por Hidrocarburos en el Campo Petrolero Samaria, Tabasco, p. 262.

## **GLOSARIO**

---

### **A**

**Aducto:** un aducto es un complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como ADN o proteínas. Los aductos de ADN resultan de una exposición a carcinogénicos.

**Aneugénico:** Proceso de alteración del número normal de cromosomas en el que se pierde un cromosoma.

**Aneuploidia:** cambios en el número de cromosomas, que pueden dar lugar a enfermedades genéticas.

**Antioxidante:** sustancias cuya acción consiste en inhibir la tasa de oxidación de los radicales libres produciendo un daño celular.

**Apoptosis:** es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente.

### **C**

**Clastogenicidad:** rompimientos de las cadenas del ADN no reparadas.

### **D**

**Daño oxidativo:** El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de las células a diversos factores que producen una ruptura.

### **E**

**Estrés oxidativo:** Afección en la cual las concentraciones de antioxidantes son más bajas de lo normal.

### **G**

**G1:** Periodo comprendido entre el final de la telofase y la fase S del ciclo celular.

**G2:** Periodo comprendido entre el final de la fase S y el comienzo de la profase.

## **ABREVIATURAS**

---

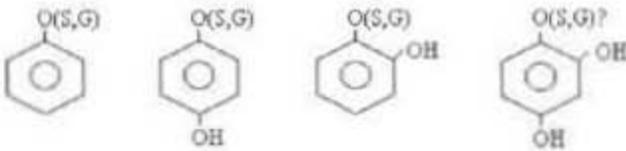
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>Ant:</b>	Antraceno
<b>BP:</b>	Benzo[a]pireno
<b>BaA:</b>	Benzo Antraceno
<b>Bghi :</b>	Benzo ghi
<b>BrdU:</b>	5-bromo-2'-desoxiuridina
<b>CPC:</b>	Cinética de Proliferación Celular
<b>CBPI:</b>	Índice de Bloqueo de la Citocinesis
<b>CMN:</b>	Células Micronucleadas
<b>C.P.G:</b>	Complejo procesador de gas
<b>C.P.Q.:</b>	Complejo petroquímico
<b>CBN :</b>	Células binucleadas
<b>Cyt-B:</b>	Citocalasina-B
<b>Cry:</b>	Criseno
<b>Fla:</b>	Fluoranteno
<b>HPAs:</b>	Hidrocarburos Policíclicos aromáticos
<b>ICH:</b>	Intercambio de cromátidas hermanas
<b>ICH/CEL:</b>	Intercambio de cromátidas hermanas por célula
<b>ICH/CRO:</b>	Intercambio de cromátidas hermanas por cromosoma
<b>IM:</b>	Indice mitótico
<b>IR:</b>	Indice de replicación
<b>Ind:</b>	Indeno
<b>MN:</b>	Micronúcleos
<b>IDN:</b>	Índice de División Nuclear
<b>Phe:</b>	Fenantreno
<b>Pyr:</b>	Pyreno

# **ANEXOS**

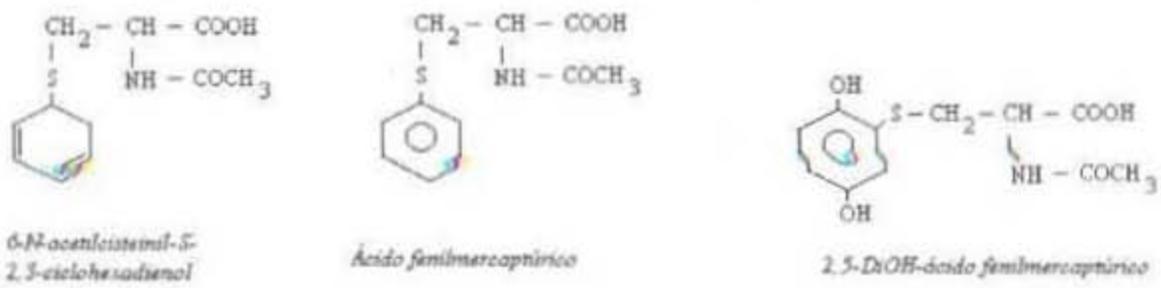
**APENDICES:**

**APENDICE A: Metabolitos urinarios del Benceno**

**1. Conjugados de sulfato y glucoronido**



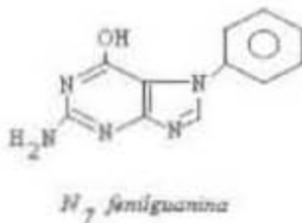
**2. Ácidos mercaptúricos**



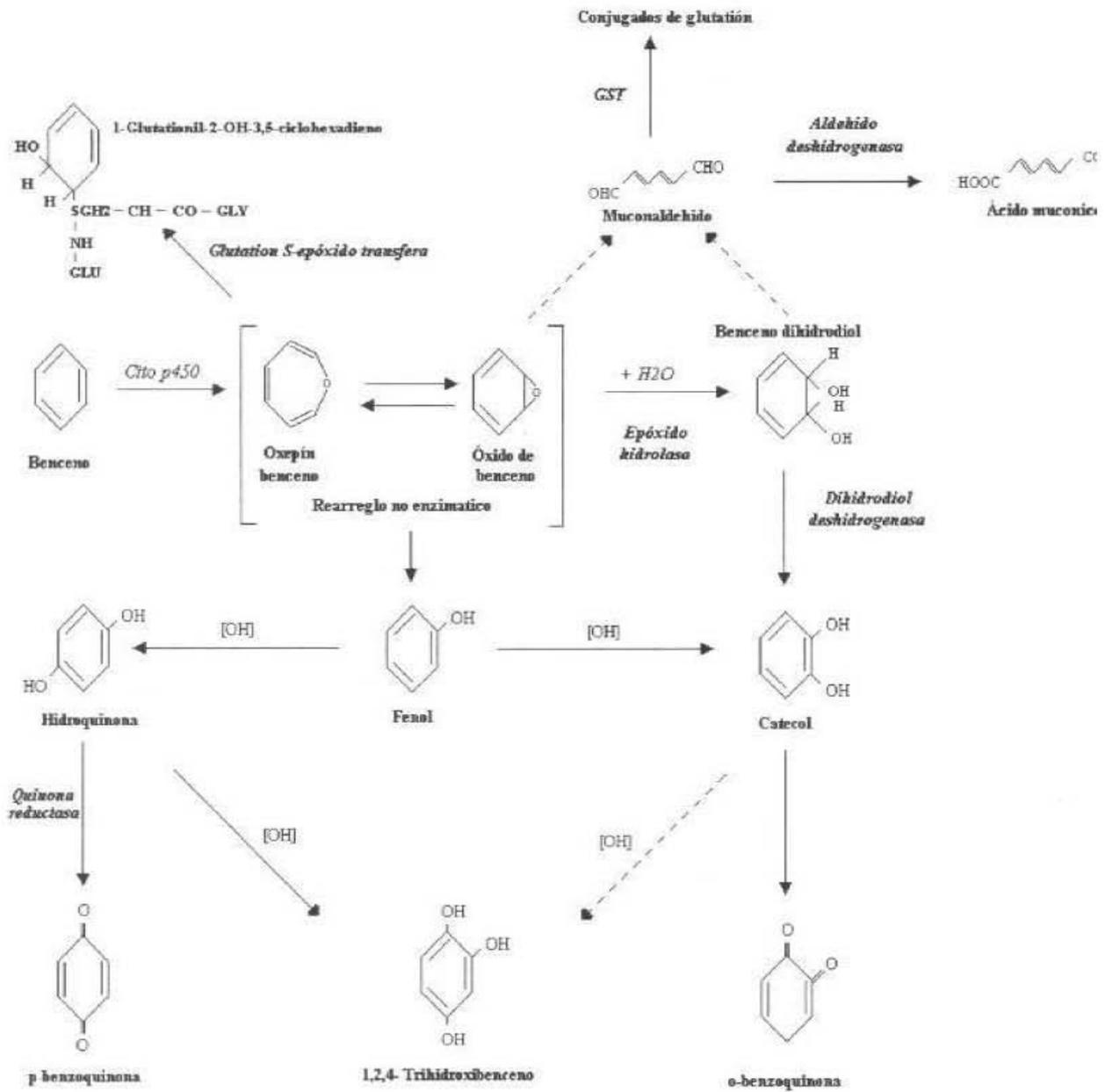
**3. Metabolitos de anillo abierto**



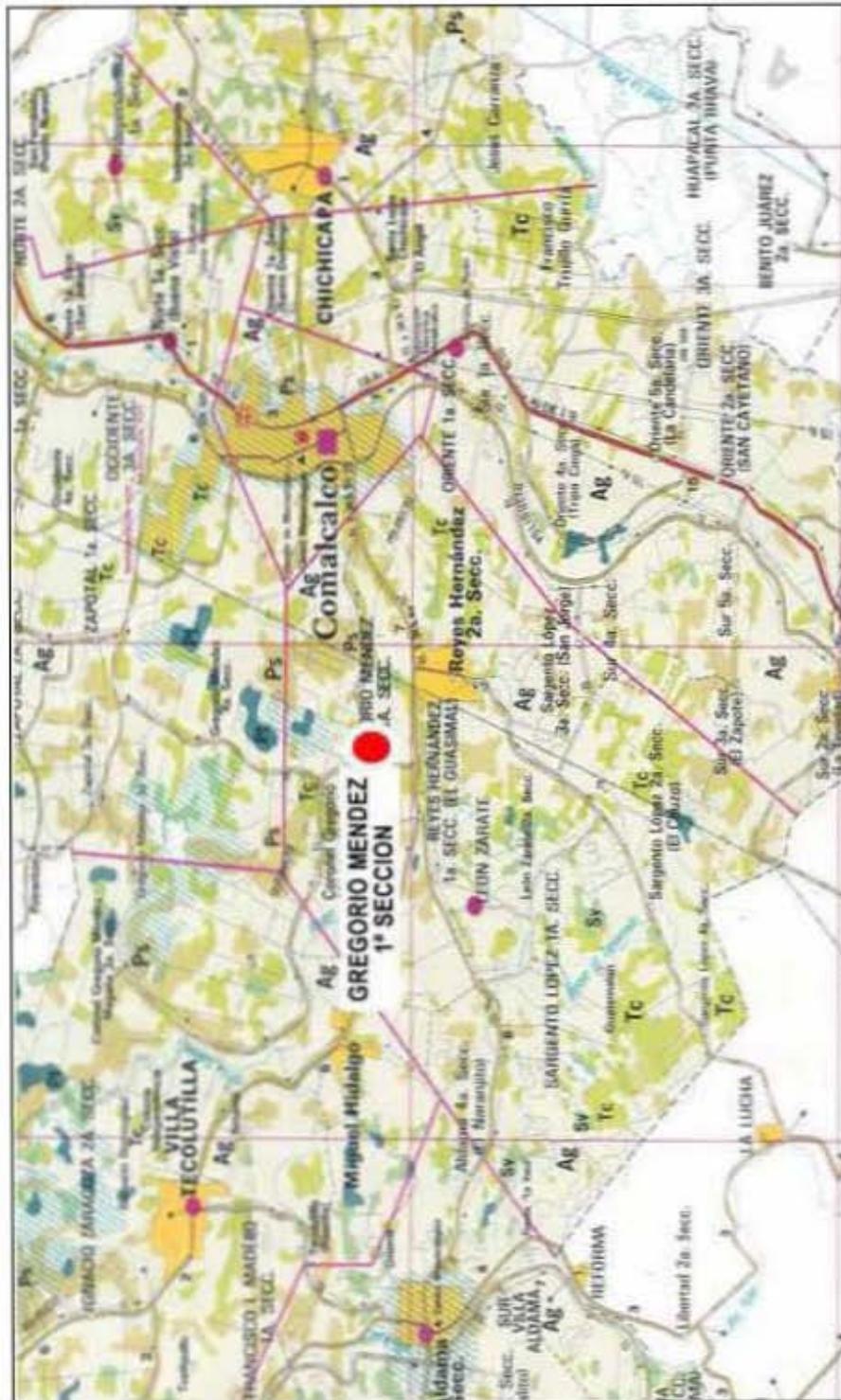
**4. Residuo de un aducto de ADN**



### APENDICE B: Metabolismo del Benceno



**APENDICE C: Carta Geográfica Municipal de Comalcalco, (Tab. 1997).**



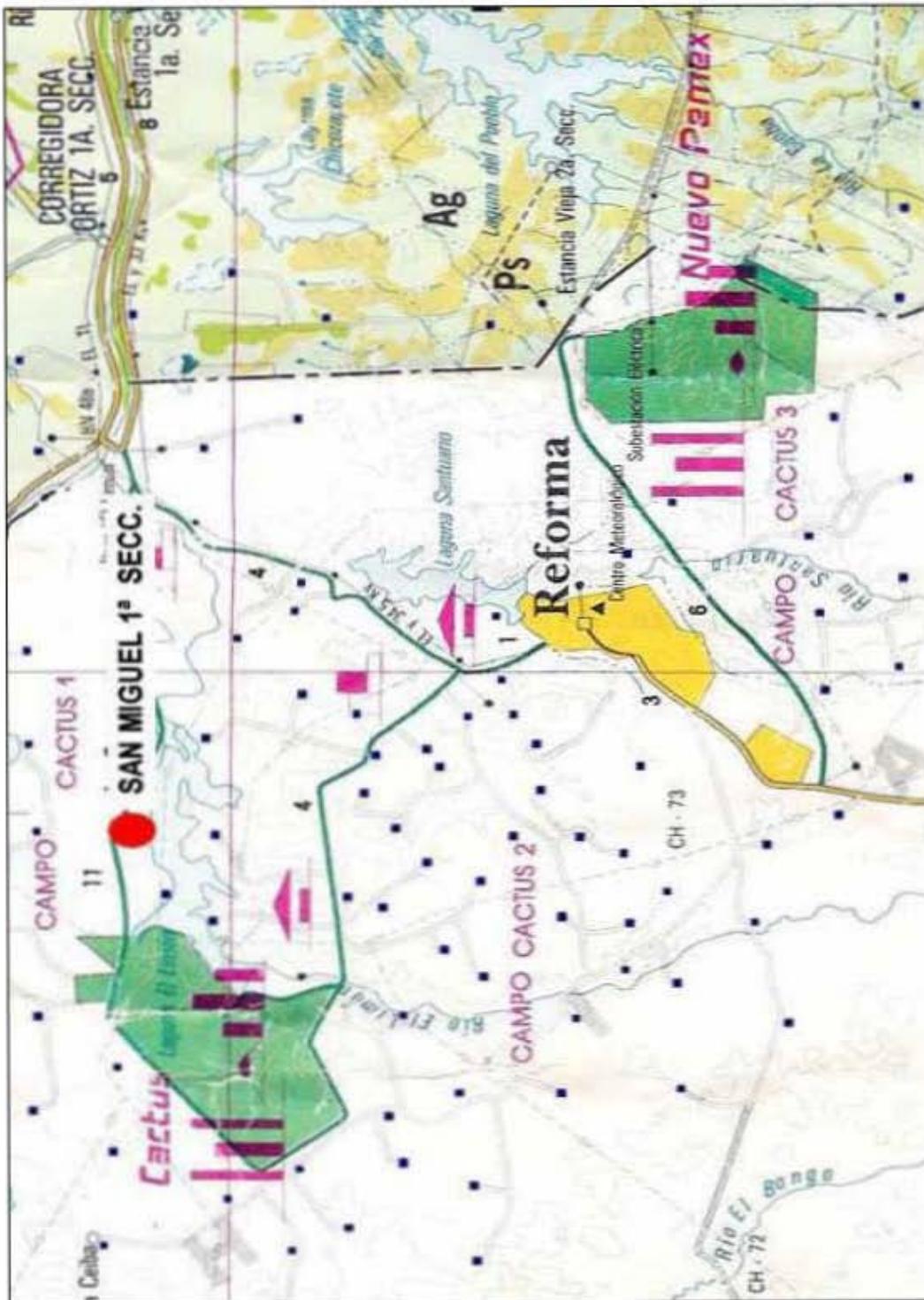
**Comunidad de Gregorio Méndez 1ª Secc., Comalcalco, Tabasco.**

**APENDICE D: Carta Geográfica Municipal de Paraíso, (Tab, 1997).**



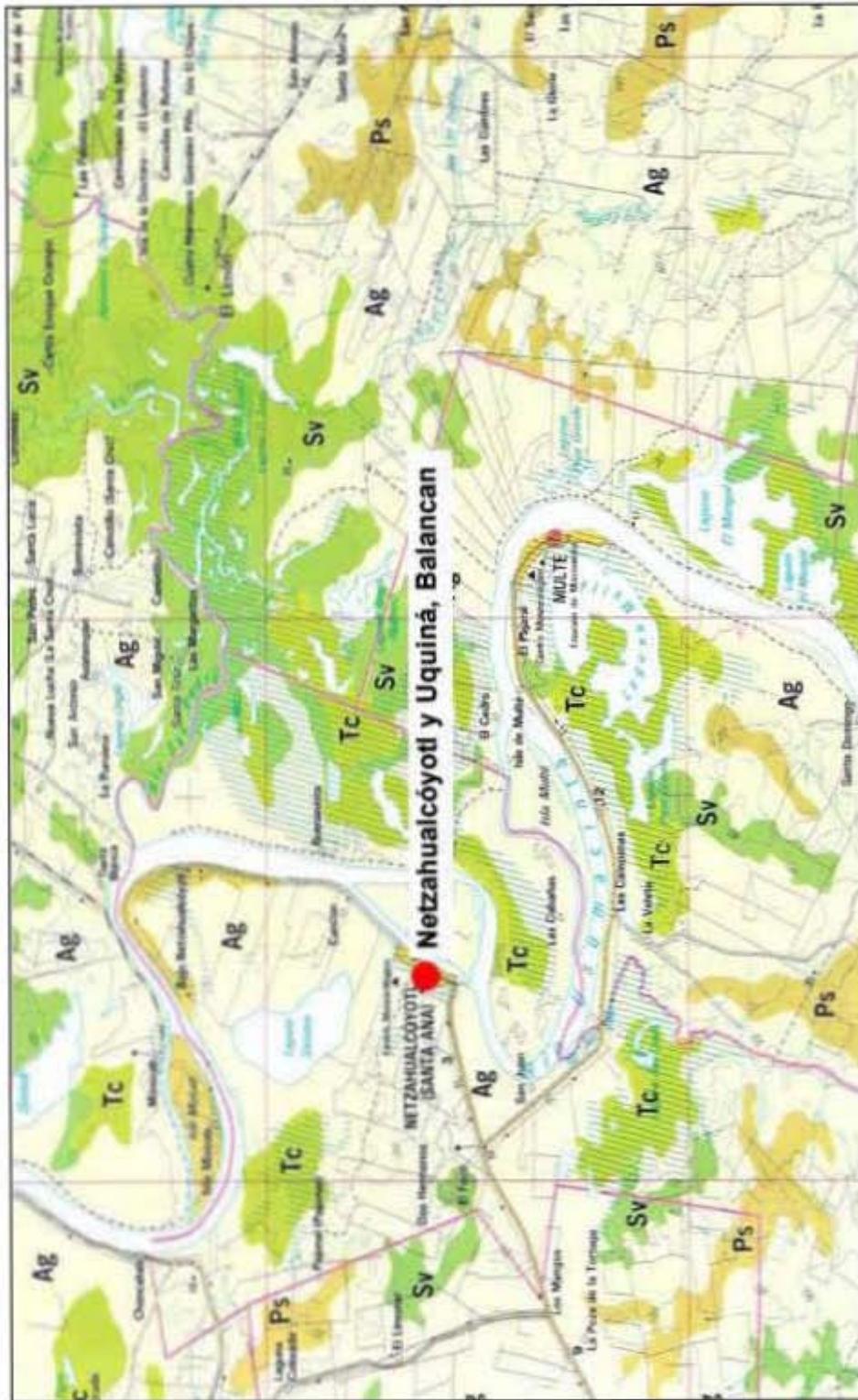
Comunidad de Nuevo Torno Largo, Paraíso, Tabasco.

**APENDICE E: Carta Geográfica Municipal de Reforma, (Chiapas. 1997).**



Localización de la comunidad de San Miguel 1ª Secc., Reforma, Chiapas.

**APENDICE F: Carta Geográfica Municipal de Balcan, (Tab,1997).**



**Comunidad de Netzahualcóyotl, Balcan, Tabasco.**





**APENDICE I:****Procedimiento para la calibración del equipo Hi-Vol con el Rotámetro**

El proceso de calibración del equipo de monitoreo se realiza de dos formas: primero se calibra el motor con un rootsmeter (rotámetro) a condiciones de laboratorio y después se calibra el equipo con una válvula tipo venturi.

## a) Calibración Inicial con el Rotámetro (Rootsmeter):

- ◆ El equipo debe operar a 10 scfm (0.114 a 0.285 m<sup>3</sup>/min)
- ◆ Medir o calcular la presión en mmHg y la temperatura en Kelvin en condiciones ambientales del laboratorio donde se lleva a cabo la calibración, mediante la siguiente ecuación:

$$T1 \text{ en K} = 273 + T1 \text{ en } ^\circ\text{C}$$

- ◆ Checar que el manómetro de agua y de mercurio marquen cero.
- ◆ Prender 5 minutos el motor para que se estabilice.
- ◆ Medir el tiempo (minutos) requerido para llegar a un volumen conocido (aprox. 200 a 300 ft<sup>3</sup> de aire por cada plato de calibración con diferente diámetro) a través del Rotámetro.
- ◆ La simbología es la siguiente:  $\Delta H$ : Presión del manómetro de agua (inH<sub>2</sub>O).  
 $\Delta P$ : Presión del manómetro de mercurio (mmHg).
- ◆ Calcular el valor de corrección del volumen ( $V_{std}$ ):

$$V_{std} = V_m [(P_a - \Delta P) / P_{std}] (T_{std} / T_a)$$

Donde:

$V_m$ : Volumen actual medido por el rotámetro (m<sup>3</sup>)

$P_a$ : Presión barométrica durante la calibración (mmHg)

$\Delta P$ : Presión diferencial en la entrada del volumen medido (mmHg)

$P_{std}$ : 760 mmHg

$T_{std}$ : 296 K

$T_a$ : Temperatura ambiente durante la calibración (K)

- ◆ El índice de flujo estándar medido por el rotámetro puede ser calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$Q_{std} = V_{std}/\theta$$

Donde:

Q<sub>std</sub>: índice de flujo volumétrico estándar (m<sup>3</sup>/min)

θ: Tiempo transcurrido (min)

- ◆ Calcular ΔZ.  $\Delta Z = [\Delta H(P1/P_{std}) (298/T1)]^{1/2}$
- ◆ Realizar una regresión lineal, en el eje de las “y” es ΔZ y el eje de las “x” es Q<sub>std</sub>, en cuyo punto de intercepción será B1 y la pendiente M1 y la correlación CC1.

#### **b) Calibración del Medidor Magnético (Anexo: Apèndice “J”).**

- ◆ El muestreador debe operar con un índice de flujo volumétrico estandarizado de 0.114 a 0.285 m<sup>3</sup>/min.
- ◆ Se calienta el motor durante 10 minutos, antes de la calibración.
- ◆ Se conecta el manómetro de agua en el motor y se manipula la válvula del tubo venturi (abriendo y cerrando) hasta que la lectura del medidor magnético marque entre 70 y 60 pulgadas de H<sub>2</sub>O (Anexo: Figura 5.1,A.3)
- ◆ La simbología es la siguiente: Y1: Presión del manómetro de agua (inH<sub>2</sub>O).  
Y2: Lectura del medidor magnético (inH<sub>2</sub>O)
- ◆ Se coloca un variador de voltaje al equipo, se opera al máximo, para poder confirmar que el medidor magnético registra un flujo de 100 inH<sub>2</sub>O.
- ◆ Se calculan los valores del flujo de los orificios del manómetro (Y3), mediante la siguiente ecuación:

$$Y3 = [Y1(Pa/760) (298/Ta)]^{1/2}$$

Donde:

Y1: Medición del manómetro de agua en pulgadas

Y3: Valor calculado del orificio del manómetro

- ◆ Se calcula el valor del medidor magnético (Y4) de la siguiente forma:

$$Y4 = [Y2(Pa/760) (298/Ta)]^{1/2}$$

- ◆ El índice de flujo (X1) se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$X1 = (Y3-B1)/M1$$

Se realiza una regresión lineal, tomando como X1 en el eje de las “x” y Y4 como eje de la “y”, donde el punto de intercepción será B2 , la pendiente M2 y la correlación CC2 (ver curva de calibración del medidor magnelético en el Anexo: figura 5.1.A.3).

**APENDICE J :**

**Formato de calibración para el Medidor Magnehelico**

HOJA DE CALIBRACION EN CAMPO DEL EQUIPO HI-VOL MODIFICADO  
(Compendium METHOD TO-13 PAH Sampler Calibration)

Name: MA. TERESA GAMBOA RODRIGUEZ

Calibration Date: 24 DE OCTUBRE DEL 2000, DIVISION ACADEMICA DE CIENCIAS BIOLOGICAS,  
LABORATORIO DE ECOTOXICOLOGIA AMBIENTAL.

Calibration Ambient Temperature: 303.5 K Calibration Ambient Barometric Pressure: 740.88 mmHg

Intercep (B1): 0.4213 Slope (M1): 1.539 Correlation Coefficient (CC1): 0.9782  
(B2): 3.0299 (M2): 34.287 (CC2): 0.9665

Actual values from calibration		Calibrated values		
Orife manometer, inches (Y1)	Monitor magnehelic, inches (Y2)	Orife manometer (Y3)	Monitor magnehelic (Y4)	Calculated value orifice flow. scm (X1)
0.433	70	0.643	8.184	0.144
0.393	60	0.613	7.577	0.124
0.373	50	0.597	6.917	0.114
0.314	40	0.548	6.187	0.082
0.286	30	0.523	5.358	0.066
0.255	20	0.493	4.374	0.046

Definición de variables

Y1= Calibration orifice reading, inH2O

Y2= Monitor magnehelic reading, inH2O

Pa= Barometric pressure actual, mmHg

B1= Manufacturer's Calibration orifice Intercept

M1= Manufacturer's Calibration orifice manometer slope

Y3= Calculated value for orifice manometer  
=  $[Y1(Pa/760) (298/Ta)]^{1/2}$

Y4= Calculated value for magnehelic  
=  $[Y2(Pa/760) (298/Ta)]^{1/2}$

X1= Calculated value orifice flow scm  
=  $(Y3-B1)/M1$

Pstd= Barometric pressure standard,  
760 mmHg

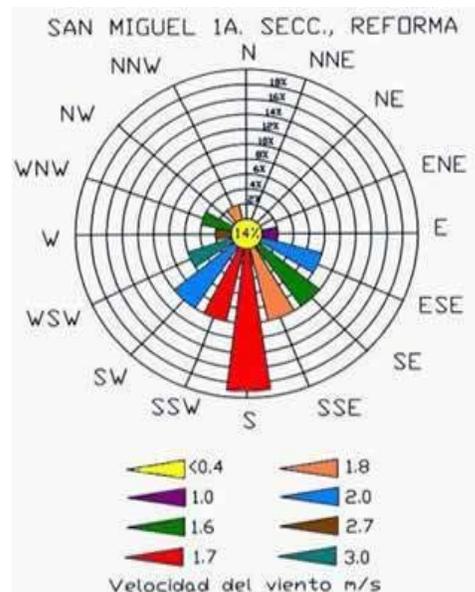
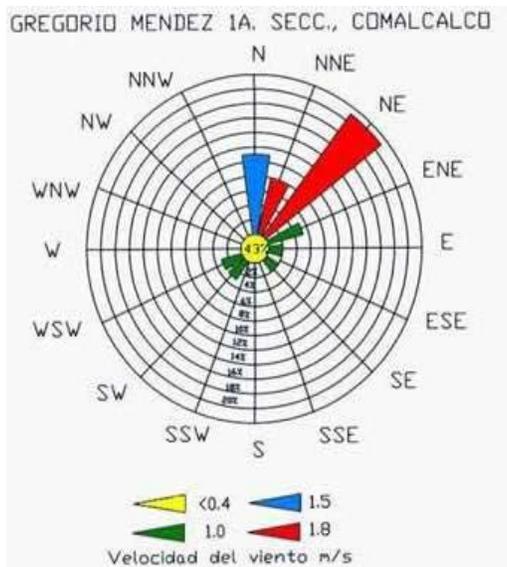
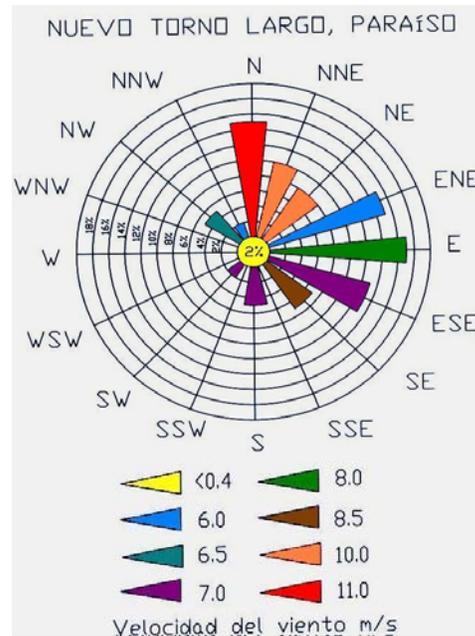
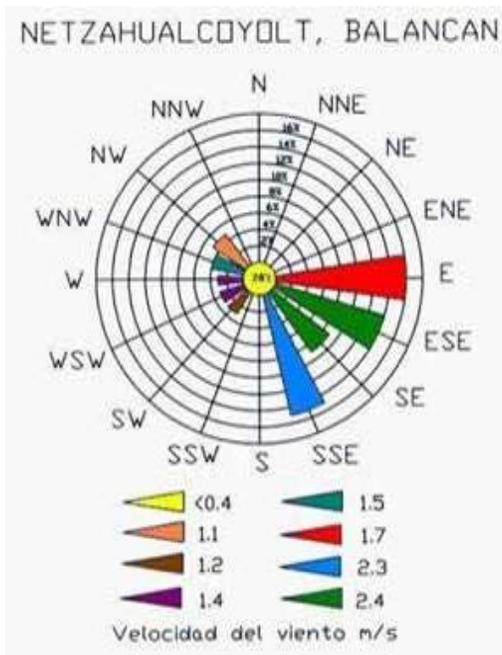
Ta= Temperature actual, K

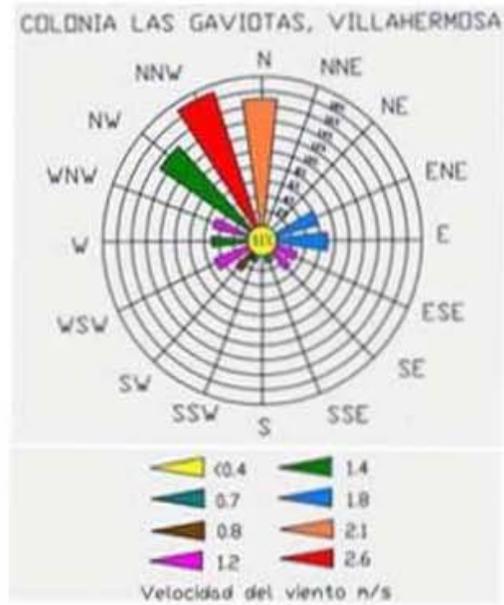
Tstd= Temperature standard, 298 K

**APENDICE K:**

**Diagrama de las Rosas de Viento de los Sitios de Monitoreo**

Las rosas de viento indican la velocidad y dirección del viento, así como el porcentaje de calmas en cada sitio de monitoreo de HPA's





**APENDICE L: Encuesta Epidemiológica**

UNIVERSIDAD JUAREZ AUTONOMA DE TABASCO  
División Académica de Ciencias Biológicas

*Estudio sobre Biomarcadores de Genotoxicidad en población infantil del estado de Tabasco.*

Esta encuesta es voluntaria. Toda la información que Ud. proporcione será confidencial y será utilizada solo con fines científicos.

Localidad:  Expediente:   
 No. De muestra:  Hora de toma:   
 Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: M F Edad: \_\_\_\_\_ años.  
 Peso \_\_\_\_kg. Talla \_\_\_\_cm. Nombre de la Madre o tutor: \_\_\_\_\_  
 Domicilio: \_\_\_\_\_ Mpio: \_\_\_\_\_  
 Cerca de (Referencias): \_\_\_\_\_  
 Tiempo de residencia: \_\_\_\_\_ Años. Residencia anterior: \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PERSONALES:**

Cual de las siguientes enfermedades has padecido:  
 Sarampión, Rubéola, Varicela, etc. ( ) Infecciones Gastrointestinales ( ) Paperas ( )  
 Infecciones Vías respiratorias ( ) Alergias ( ) Cáncer ( )  
 Has padecido alguna de ellas en el ultimo mes: (S) (N) Cuales? \_\_\_\_\_  
 Si recibió medicamento para alguna de ellas, indique Cual: \_\_\_\_\_  
 Recibe actualmente algún tratamiento medico: (S) (N) Cual? \_\_\_\_\_  
 Con que finalidad? \_\_\_\_\_ Desde hace cuanto tiempo? \_\_\_\_\_  
 Vacunas mas recientes: \_\_\_\_\_ Cuando? \_\_\_\_\_  
 Desparasitante mas reciente: \_\_\_\_\_ Cuando? \_\_\_\_\_  
 Estudios de Rayos X en el ultimo año: (S) (N) Cuando? \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES:**

Familiar	Presión alta	Diabetes	Cáncer	Malformaciones
Abuelo paterno				
Abuela paterna				
Abuelo materno				
Abuela materna				
Padre				
Madre				
Hermano(a) 1				
Hermano(a) 2				
Hermano(a) 3				
Tío(a) 1				
Tío(a) 2				
Tío(a) 3				
Primo(a) 1				
Primo(a) 2				
Primo(a) 3				

\*Numerar a los hermanos de mayor a menor.

**ESTILOS DE VIDA:**

Actividad del Padre: \_\_\_\_\_ Fuma: (S) (N) Trabaja con plaguicidas: (S) (N)  
 Actividad de la Madre: \_\_\_\_\_ Fuma: (S) (N) Trabaja con plaguicidas: (S) (N)  
 Sabe cuales plaguicidas? \_\_\_\_\_  
 Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces al mes/año  
 Utiliza ropas especiales? (S) (N)  
 Los guarda dentro de la casa? (S) (N)  
 El donador ha manejado plaguicidas? (S) (N)  
 En los últimos 6 meses? (S) (N)  
 Cuantas veces? \_\_\_\_\_  
 Utilizó ropas especiales? (S) (N)  
 Algún tipo de protección? (S) (N) Cual? \_\_\_\_\_  
 El donador participa en labores agrícolas? (S) (N)  
 Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces/semana  
 Vive cerca de un campo agrícola? (S) (N)  
 A que distancia? \_\_\_\_\_mts.  
 Se fumiga en el? (S) (N) Frecuencia? \_\_\_\_\_  
 En casa para controlar el mosquito se utiliza: \_\_\_\_\_ Intensidad (L) (M) (S) Dentro/ Fuera  
 En casa para controlar la hormiga se utiliza: \_\_\_\_\_ Intensidad (L) (M) (S) Dentro/ Fuera  
 Otro insecticida que utilice en casa: \_\_\_\_\_ Intensidad (L) (M) (S)  
**(L)Leve=Menos de una vez por mes**  
**(M) Moderado=Menos de una vez por semana**  
**(S) Severo=mas de una vez por semana**

Vive cerca de una instalación petrolera? S N A que distancia? \_\_\_\_\_ mt.  
 Tipo de instalación: \_\_\_\_\_  
 Detecta olores raros o desagradables en el hogar? (S) (N)  
 Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces/semana  
 Detecta olores raros o desagradables en el la escuela? ? (S) (N)  
 Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces/semana  
 El agua que toma es de: (Pozo) (Río) (Llave) (Garrafón)  
 Detecta algún sabor raro o desagradable en el agua que toma? (S) (N)  
 En casa la estufa es de: (Leña) (Gas) (Petróleo) Dentro/Fuera

**OBSERVACIONES:**

---



---



---

Encuestó: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

Manifiesto que he ido enterado de las características generales del estudio, así como de los procedimientos que van a ser utilizados para la toma de muestras, estando de conformidad con ello doy mi consentimiento para que mi hijo participe en el estudio.

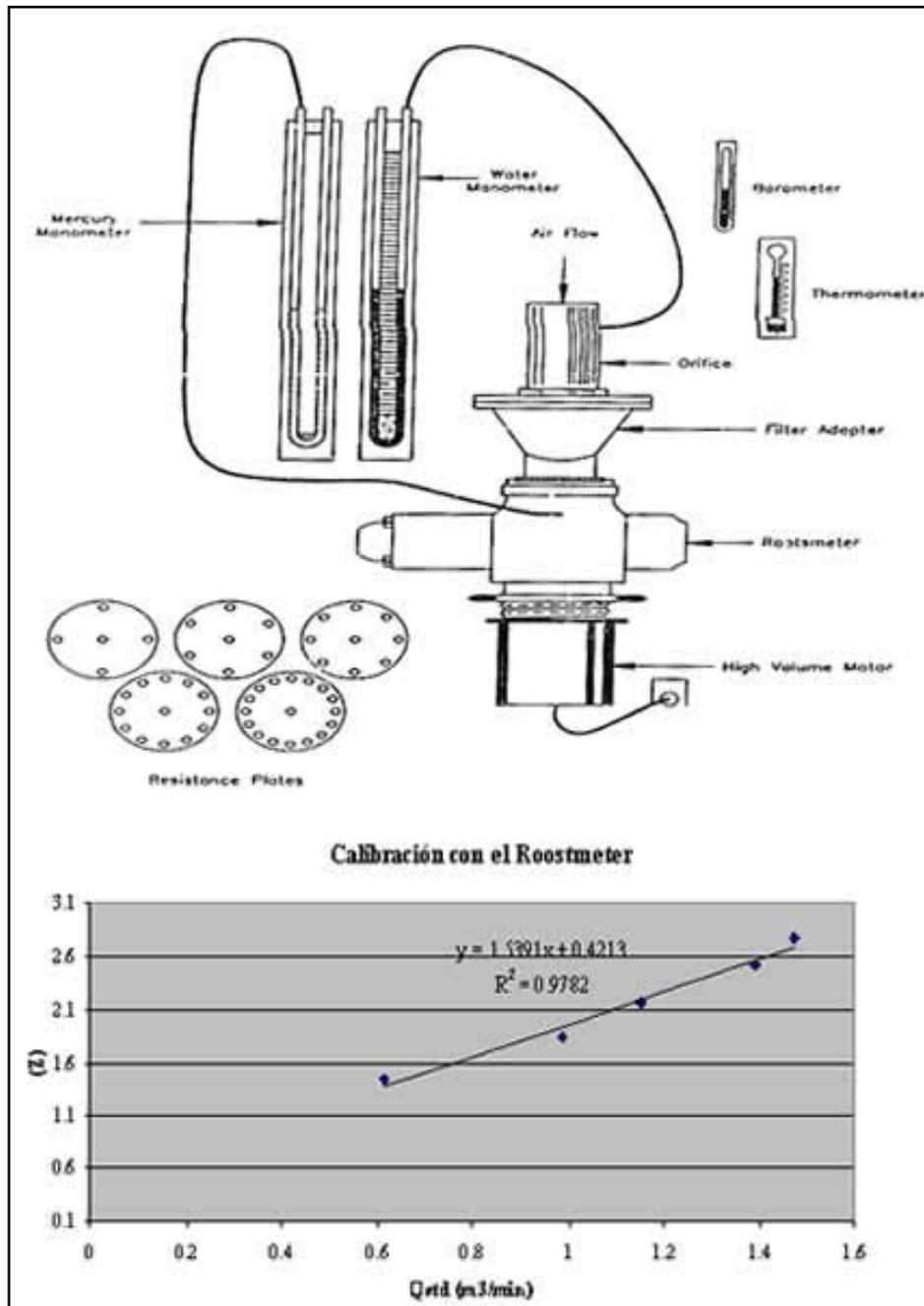
Nombre y firma del tutor

**APENDICE M : Factores de Riesgo en la Salud Asociado con Genotoxicidad encontrados en el estudio con valores estadísticos significativos ( $p < 0.5$ )**

Variable	MN/ celula (n=73)	Ind de Div Nucl(n=72)	I M (n=71)	I de Repl (n=71)	ICH/ CEL	ICH/ CROM	cola/cabeza	tamaño cola
tipo de combustible para cocinar	0,03							
enfermedad viral	0,001							
benzo(a) antraceno	0,021				0,014	0,016	0,001	0,005
Criseno	0,006						0,002	0,036
dibenzo(a,h)antraceno	0,005			0,001 ( $r^2=0.4788$ )				
uso de plaguicidas en la casa	0,027 ( $R^2=0.32$ )			0,021 ( $r^2=0.4788$ )				
Edad		0,068 ( $r^2=0.1983$ )						
Sexo		0,008						
antecedente familiar de malformaciones.		0,017					0,021	
índice de masa corporal			0,015				0,038	0,028
población rural			0,001	0,019				
estufa de leña o gas			0,029					
usa plaguicidas la madre			0,016					
acenafteno			0,001					
fluoreno			0,001					
antraceno			0,013					
fluoranteno			0,001					
pireno			0,012					
indeno(1,2,3-C,D)Pireno			0,008					
benzo(a) pireno					0,008	0,016	0,001	0,001
benzo(k)fluoranteno							0,001	0,014
uso de insecticidas				0,08				
tabaquismo materno							0,026 ( $r^2=0.446$ )	
veces que usó plaguicidas							0,039 ( $r^2=0.40$ )	
antecedente de cáncer en la familia.							0,001	0,004
distancia del campo agrícola				0,037				
usa plaguicidas el padre								0,03
distancia de la instalación petrolera								0,028
acenaftileno								0,047
benzo(ghi) perileno								0,004

**FIGURAS:**

**Figura 5.1.A.2. Calibración del equipo de muestreo Hi-Vol modificado, utilizando el Rootsmeter (Rotámetro), por medio de transferencia de flujo de aire, a través de un punto crítico estándar.**



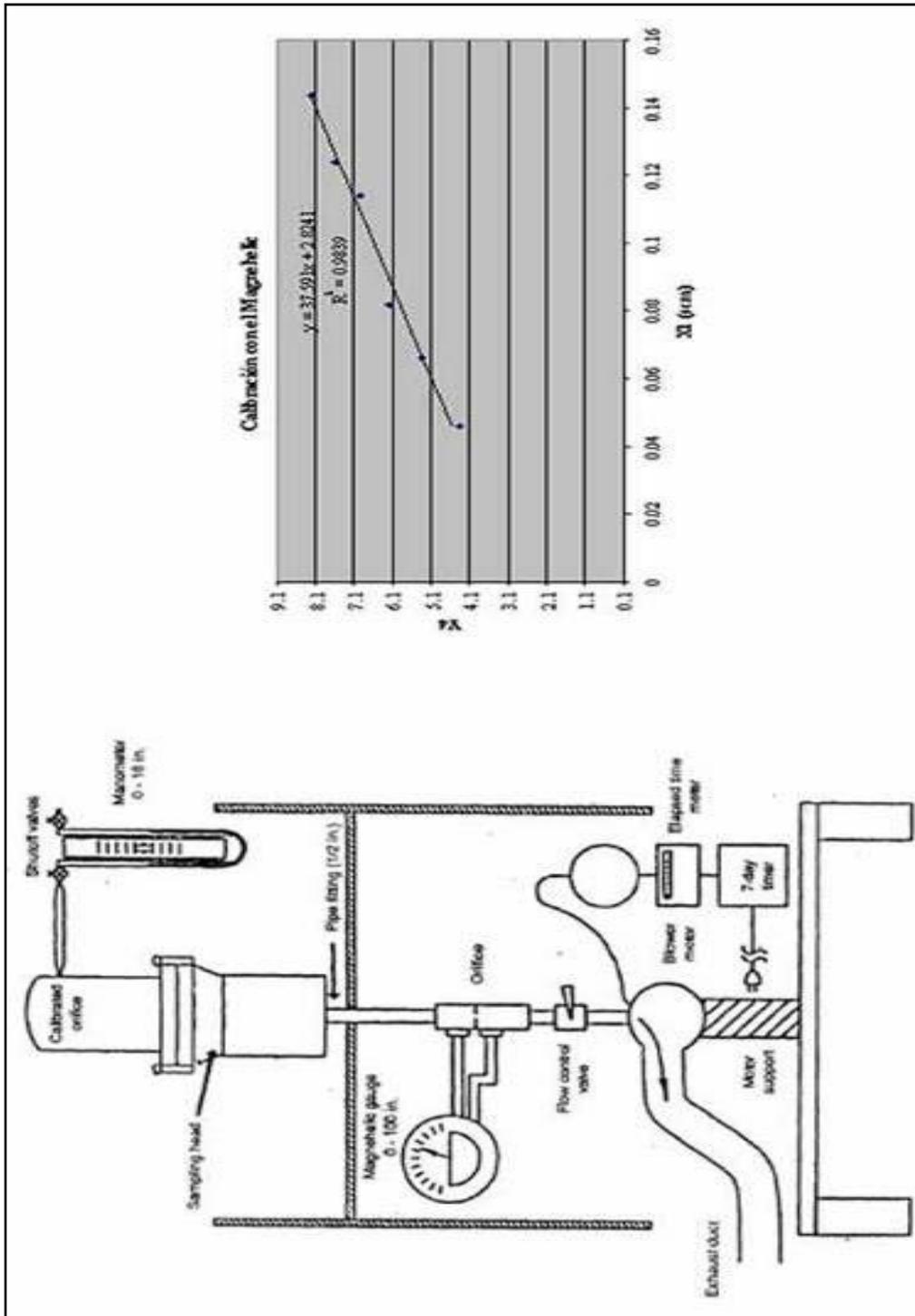


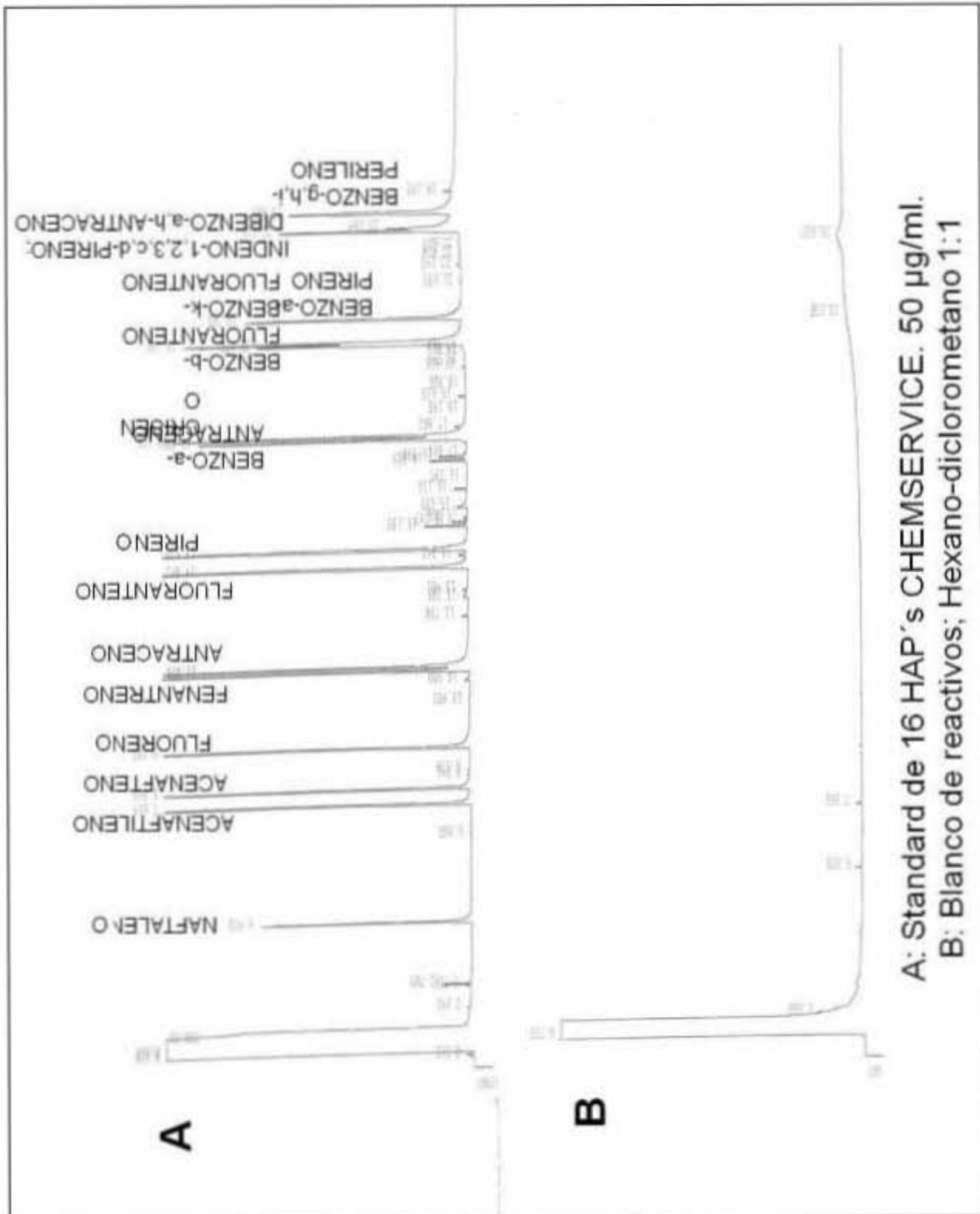
Figura 5.1.A.3 . Calibración del flujo de aire con el Medidor Magnelético del equipo de muestreo Hi-Vol modificado.

**Figura 5.1.A.4. Estación de meteorología (Marca Davis Instrument)**

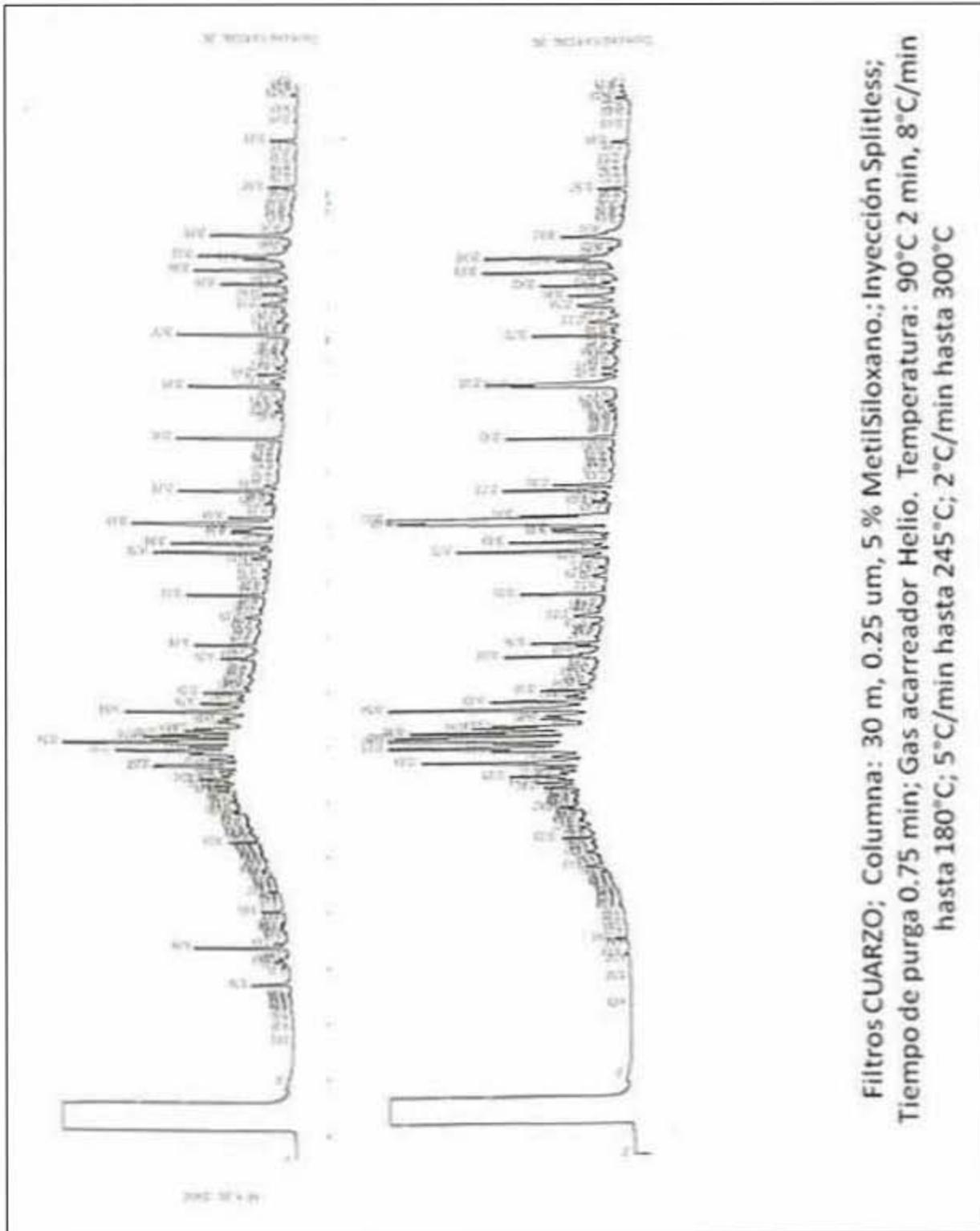


**GRAFICAS:**

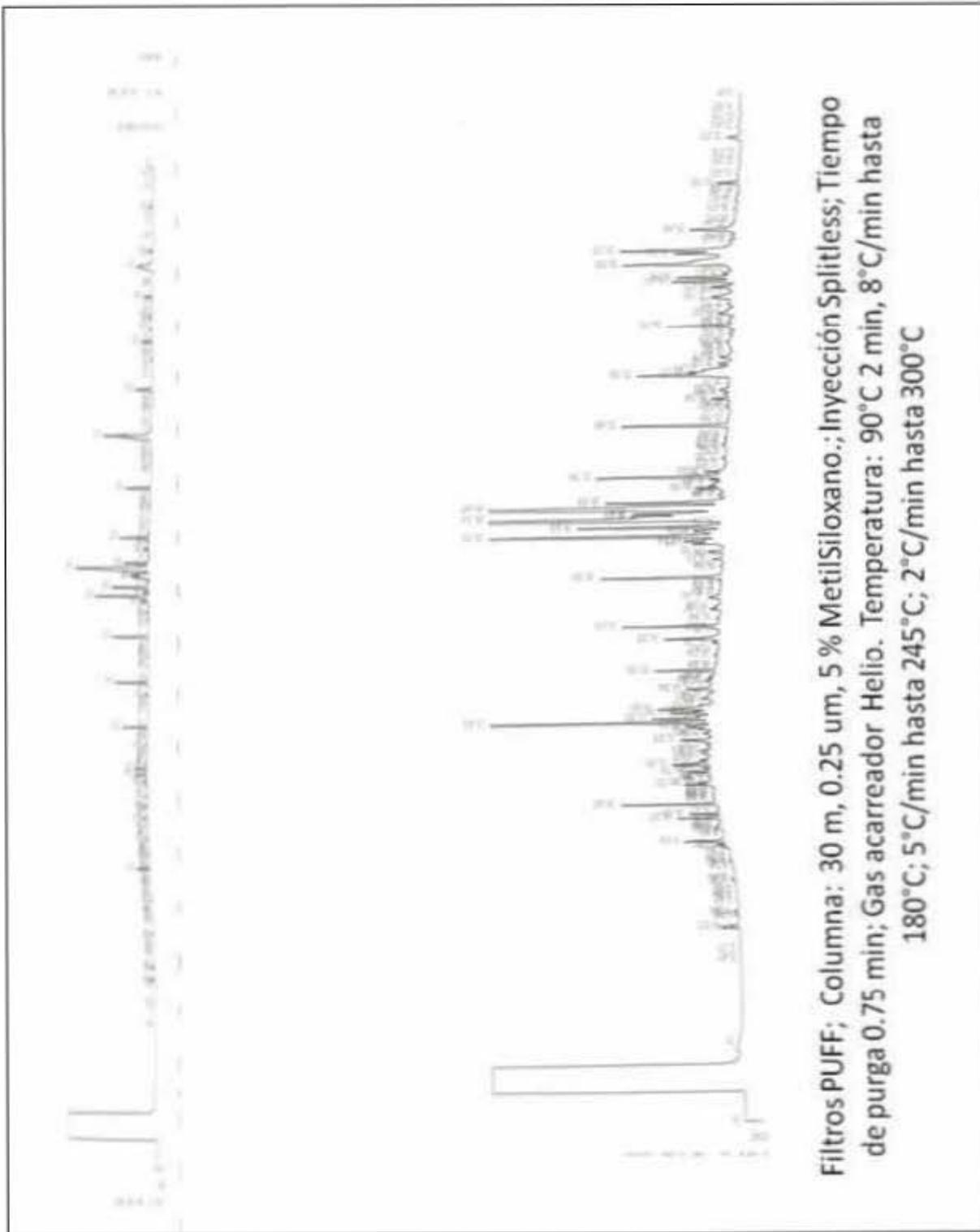
**Gráfica 6.13.17. Cromatograma del standard de referencia con 16 HPA's (A) y Cromatograma con el blanco de reactivos Hexano- Diclorometano (1:1)**



**Gráfica 6.13.18. Ejemplo de cromatograma de la muestra de 16 HPA's en fase particulada utilizando filtros de CUARZO.**



**Gráfica 6.13.19. Ejemplo de Cromatograma de muestra de HPA's en fase gaseosa, utilizando filtros PUFF.**



## TABLAS:

Tabla 4.7. Condiciones meteorológicas de cada sitio por días de monitoreo.

Sitio de Monitoreo	No. Muestra	Temperatura Ambiente (°C)	Presión Atmosférica (mmbar)	Humedad Relativa (%)	Velocidad Viento (m/s)	Dirección del viento	Precipitación (mm)	Dirección del Viento en grados
Netzahualcóyotl y Uquiná, Balancan	1	26.1	1030.6	76.6	1.95	ESE	0.0	112.5
	2	26.5	1028.2	76.2	1.95	ESE	0.0	112.5
	3	27.6	1027.8	76.6	1.7	E	0.0	90
	4	28.4	1026.7	75.1	1.5	NW	0.0	315
	5	27.2	1030.9	79.1	1.1	NW	0.0	315
	6	26.8	1033.3	82.0	0.7	NW	1.3	315
Gregorio Mendez, Comalcalco	1	20.7	1018.3	75.4	0.4	NE	0.0	45
	2	22.9	1011.2	76.7	0.4	NNW	0.0	315
	3	25.6	1010.6	77.4	0.6	N	0.0	0
	4	23.7	1013.2	78.9	0.8	N	1.7	0
	5	23.9	1015.2	89.9	0.6	NE	16.2	45
	6	22.8	1015.6	87.0	0.5	NNE	0.3	22.5
	7	23.5	1015.9	84.9	0.5	NNE	1.6	22.5
Nuevo Torno Largo, Paraíso	1	24.5	1011.5	N.R.	7.0	E	0.0	90
	2	24.7	1012.5	N.R.	11.1	N	0.0	0
	3	25.0	1012.0	N.R.	16.6	NNE	7.0	22.5
	4	24.3	1018.5	N.R.	9.0	NNE	7.0	22.5
	5	20.0	1013.5	N.R.	9.72	NNE	5.0	22.5
	6	18.0	1009.5	N.R.	3.5	ENE	0.0	67.5
	7	21.0	1014.5	N.R.	5.0	NE	0.0	45
	8	19.5	1016	N.R.	4.8	E	2.0	90

**Tabla 4.7. Condiciones meteorológicas de cada sitio por días de monitoreo (continuación)**

Sitio de Monitoreo	No. Muestra	Temperatura Ambiente (°C)	Presión Atmosférica (mmbar)	Humedad Relativa (%)	Velocidad Viento (m/s)	Dirección del viento	Precipitación (mm)	Dirección del Viento en grados
San Miguel, Reforma	1	30.8	1004.9	59.6	1.15	S	0.0	180
	2	25.6	1006.9	60.5	1.55	SSE	0.0	157.5
	3	28.8	1008.1	64.7	1.75	SE	0.0	135
	4	27.6	1006.9	75.3	1.2	ESE	0.0	112.5
	5	25.1	1012.8	80.7	1.65	WSW	0.0	247.5
	6	25.9	1013.0	76.4	1.35	SW	0.0	225
Col Gaviotas, Villahermosa, Centro	1	23.6	1019.6	75.0	1.18	ENE	0.0	67.5
	2	24.1	1020.6	82.1	1.84	N	0.0	0
	3	21.1	1024.8	92.7	2.2	NNW	88.5	315
	4	25.1	1016.0	75	1.78	E	0.0	90
	5	24.7	1019.5	78.7	1.42	N	0.0	0
	6	23.8	1019.8	81.3	1.66	N	26.5	0
	7	22.3	1019.7	76.8	1.22	NNW	0.0	315

**Tabla 6.3.A Número de muestras por sitio y condiciones de operación del equipo de muestreo (Hi-Vol) durante cada día de monitoreo.**

No. MUESTRA	DIAS		HORAS		LECTURA MEDIDOR MAGENLETICO (inH <sub>2</sub> o)		
	INICIO	FIN	INICIO	FIN	INICIO	FIN	PROMEDIO
<b>NETZAHUALCOYOTL Y UQUINA, BALANCAN</b>							
1	5/11/00	6/11/00	6:00 am	5:10 am	60	60	60
2	6/11/00	7/11/00	5:28 am	5:05 am	60	63	61.5
3	7/11/00	8/11/00	5:30 am	5:00 am	62	62	62
4	8/11/00	9/11/00	5:23 am	5:03 am	63	63	63
5	9/11/00	10/11/00	5:22 am	5:08 am	62	60	61
6	10/11/00	11/11/00	5:25 am	5:00 am	61	63	62
7	11/11/00	12/11/00	5:00 a.m.	5:00 a.m.	60	60	60
<b>GREGORIO MENDEZ 1ª. SECCION, COMALCALCO</b>							
1	22/11/00	23/11/00	2:07 pm	11:10 pm	50	10	30
2	23/11/00	24/11/00	11:20 am	11:20 am	10	59	34.5
3	24/11/00	25/11/00	11:35 am	12:05 pm	59	60	59.5
4	25/11/00	26/11/00	12:22 pm	2:15 pm	50	50	50
5	29/11/00	30/11/00	6:30 am	6:30 am	52	50	51
6	30/11/00	01/12/00	6:36 am	6:36 am	49	60	54.5
7	01/12/00	02/12/00	6:55 am	1:25 pm	61	56	58.5
<b>NUEVO TORNO LARGO, PARAÍSO</b>							
1	15/12/00	16/12/00	9:10 am	9:23 am	62	66	64
2	16/12/00	17/12/00	9:32 am	9:15 am	68	67	67.5
3	17/12/00	18/12/00	9:25 am	8:00 am	67	66	66.5
4	18/12/00	19/12/00	8:10 am	9:00 am	67	67	67
5	21/12/00	22/12/00	8:30 am	8:30 am	70	67	68.5
6	07/01/01	08/01/01	8:05 am	5:00 am	69	66	67.5
7	08/01/01	09/01/01	5:31 am	5:10 am	66	66	66

**Tabla 6.3.A, Número de muestras por sitio y condiciones de operación del equipo de muestreo (Hi-Vol) durante cada día de monitoreo. (Continuación)**

<b>SAN MIGUEL 1ª. SECCION, REFORMA CHIAPAS</b>							
1	11/04/01	12/04/01	10:55 am	12:30 pm	70	70	70
2	12/04/01	13/04/01	12:43 pm	1:15 pm	70	70	70
3	13/04/01	14/04/01	1:30 pm	2:00 pm	70	70	70
4	14/04/01	15/04/01	2:10 pm	12:00 pm	70	72	71
5	28/04/01	29/04/01	1:30 pm	1:15 pm	70	70	70
6	29/04/01	30/04/01	1:40 pm	1:55 pm	70	76	73
7	30/04/01	01/05/01	2:20 pm	2:45 pm	70	70	70
<b>COLONIA GAVIOTAS NORTE, VILLAHERMOSA TABASCO</b>							
1	5/02/02	6/02/02	10:30 a.m.	10:41 a.m.	70	70	70
2	6/02/02	7/02/02	10:51 a.m.	11:10 a.m.	70	70	70
3	7/02/02	8/02/02	11:22 a.m.	11:43 a.m.	70	72	71
4	19/02/02	20/02/02	12:05 p.m.	12:00 p.m.	70	70	70
5	20/02/02	21/02/02	12:10 p.m.	12:25 p.m.	70	70	70
6	21/02/02	22/02/02	12:35 p.m.	12:45 p.m.	70	76	70
7	25/02/02	26/02/02	9:15 a.m.	11:25 a.m.	70	70	70