



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“EXPOSICIÓN A HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
POBLACIÓN INFANTIL”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

Q.F.B. REBECA ISABEL MARTÍNEZ SALINAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. JAQUELINE CALDERÓN HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTELAR

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ
DRA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“EXPOSICIÓN A HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
POBLACIÓN INFANTIL”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

Q.F.B. REBECA ISABEL MARTÍNEZ SALINAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. JAQUELINE CALDERÓN HERNÁNDEZ

SINODALES:

PRESIDENTE:

Dra. Catalina Alfaro de la Torre

SECRETARIO:

Dr. Jesús Mejía Saavedra

VOCAL:

Dra. Leticia Yáñez Estrada

ESTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL:

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL, FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

CON FINANCIAMIENTO DEL:

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) PROYECTO

J-37584-M

**REBECA ISABEL MARTÍNEZ SALINAS FUE BECARIA DEL CONACYT No.
186309**

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO A TRAVÉS
DEL PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO AL POSGRADO NACIONAL
(PIFOP-SEP)**

| INDICE GENERAL | Página |
|--|---------------|
| CAPITULO I. Antecedentes sobre la exposición a HAPs | |
| 1.1 Introducción | 4 |
| 1.2 Evaluación de la exposición a HAPs | 7 |
| 1.3 Hidroxipireno como biomarcador de exposición a HAPs | 8 |
| 1.4 Efectos en salud | 9 |
| CAPITULO II. | |
| 2.1 Justificación | 14 |
| 2.2 Hipótesis | 17 |
| 2.3 Objetivos | 17 |
| CAPITULO III. Metodología de muestreo | |
| 3.1 Zonas de estudio | 19 |
| 3.2 Selección de la población | 21 |
| 3.3 Muestreo biológico | 21 |
| CAPITULO IV. Metodología y validación del método analítico. | |
| 4.1 Estandarización del método analítico. | 24 |
| 4.2 Procedimiento de extracción. | 25 |
| 4.3 Validación del método analítico | 27 |
| CAPITULO V. Análisis de muestras y resultados | |
| 5.1 Tratamiento de muestras | 35 |
| 5.2 Análisis estadístico | 36 |
| 5.3 Evaluación nutricional y nivel socioeconómico | 37 |
| 5.4 Resultados | 38 |
| CAPITULO VI. | |
| 6.1 Discusión | 43 |
| 6.2 Conclusiones y recomendaciones | 48 |
| Referencias Bibliográficas | 49 |

INDICE DE TABLAS

Página

| | |
|---|----|
| Tabla 1. HAPs y sus metabolitos urinarios en humanos. | 58 |
| Tabla 2. Condiciones cromatográficas | 25 |
| Tabla 3. Modificaciones en las condiciones de extracción | 26 |
| Tabla 4. Concentración de estándar para la curva de calibración | 27 |
| Tabla 5. Linealidad instrumental | 29 |
| Tabla 6. Linealidad del método analítico | 30 |
| Tabla 7. Exactitud | 31 |
| Tabla 8. Precisión instrumental | 31 |
| Tabla 9. Datos sociodemográficos de las comunidades de estudio | 59 |
| Tabla 10. Mediciones antropométricas en los niños residentes de las comunidades de estudio. | 60 |
| Tabla 11. Comparación de los parámetros de validación | 60 |
| Tabla 12. Niveles de 1-OHP en población infantil | 61 |
| Tabla 13. Índices de exposición biológica y efectos asociados | 61 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución de hornos ladrilleros y alfareros en la República Mexicana. | 62 |
| Figura 2. Población expuesta la humo de leña y carbón en la República Mexicana. | 63 |
| Figura 3. Esquemas del metabolismo y mecanismo de toxicidad De HAPs. | 64 |
| Figura 4. Localización de las zonas de estudio en el estado de San Luis Potosí. | 65 |
| Figura 5. Cromatograma de curva de 1-OHP en metanol. | 66 |
| Figura 6. Cormatograma de curva de 1-OHP en orina. | 66 |
| Figura 7. Comparación del comportamiento de las pendientes de 1-OHP. | 67 |
| Figura 8. 1-OHP por comunidades de estudio. | 67 |
| Figura 9. Concentración de 1-OHP por comunidad de estudio según tabaquismo pasivo. | 68 |
| Figura 10. Concentración de 1-OHP por comunidad de estudio según tipo de combustible energético. | 68 |
| Figura 11. Concentración de 1-OHP por tipo de combustible utilizado en hornos ladrilleros. | 69 |
| Figura 12. Concentración de 1-OHP por comunidad de estudio según rango de edad. | 69 |
| Figura 13 Porcentaje de la población por comunidad de estudio según Índices biológicos de exposición. | 70 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Reactivos y preparación de soluciones. | 72 |
| Anexo 2. Evaluación del estado nutricional. | 75 |
| Anexo 3. Cuestionario | 77 |

RESUMEN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos, producidos en forma de mezcla durante la combustión incompleta de materia orgánica o bien de forma natural formando parte de la composición de combustibles fósiles. Están clasificados como cancerígenos y su exposición en humanos ocurre principalmente en escenarios ocupacionales y ambientales a través de la inhalación de aire contaminado por fuentes móviles (transito vehicular), fuentes fijas (hornos de industrias manufactureras, quema de biomasa como fuente energética, entre otros), por exposición a humo de tabaco o por la ingesta de alimentos ahumados o asados y el consumo de agua contaminada. Otra vía de exposición a través de la piel es durante la aplicación de compuestos fabricados a base de creosotas, productos fabricados a partir de alquitrán de carbón (ungüentos).

En este trabajo se evaluó la exposición a la mezcla de HAPs en población infantil residente de tres comunidades rurales del estado de San Luis Potosí, por medio de la cuantificación de 1-hidroxipireno (1-OHP) (metabolito del pireno, HAP que se encuentra en concentraciones constantes en diversos escenarios de combustión) y elegido en la literatura como útil biomarcador de exposición a la mezcla de HAPs y que puede ser determinado en muestras de orina. Las comunidades de estudio fueron: 1) Santo Domingo (zona control) (n=17), 2) Laguna de San Vicente (zona ladrillera) (n=35) y 3) Tancuime (zona expuesta al humo de leña) (n=19). Participaron 72 individuos de 3 a 18 años de edad, se aplicó un cuestionario a los padres de familia, para conocer diversos factores de exposición como tabaquismo pasivo, quema de basura, tipo de combustible energético del hogar, consumo de alimentos asados, ahumados o cocinados con leña, tipo de combustible utilizado en la actividad ladrillera, entre otros.

Los niveles de 1-OHP en orina en cada una de las comunidades fueron los siguientes: 0.22 ± 0.16 (0.01-0.55) $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina (Cr.) en la población control, 0.55 ± 0.42 (0.04-2.25) $\mu\text{mol/mol}$ de Cr. en la población ladrillera y 2.1 ± 1.2 (0.25-4.55) $\mu\text{mol/mol}$ de Cr. en población con uso de leña. Para conocer la magnitud

de la exposición en nuestras comunidades de estudio, se utilizaron valores reportados en la literatura de 1-OHP urinario en adultos, conocidos como Índices de Exposición Biológica (BEIs por sus siglas) aplicados para la disminución de la exposición a HAPs en escenarios ocupacionales. Se encontró que el 53%, 60% y 10% (z. control, z. ladrillera y z. de humo de leña respectivamente) tuvieron niveles de 1-OHP mayores al valor propuesto para adultos no fumadores no expuestos ($0.24 \mu\text{mol/mol}$ de Cr), el 0%, 20% y 16% tuvieron valores arriba del valor propuesto para no fumadores expuestos ($0.76 \mu\text{mol/mol}$ de Cr) y el 0%, 3% y 68% presentaron valores por encima del nivel de no efecto (NOAEL, por sus siglas) de ($1.4 \mu\text{mol/mol}$ de Cr). El 42% de la zona expuesta al humo de leña presentó niveles mayores al límite de exposición ocupacional en hornos de coque ($2.3 \mu\text{mol}$ de 1-OHP/mol de Cr).

La población infantil de las tres comunidades de estudio se encontró expuesta a pireno y por lo tanto expuesta a la mezcla de HAPs. El 1-OHP en orina resultó ser un útil biomarcador, para detectar los diferentes niveles de 1-OHP de acuerdo al grado de exposición en los tres diferentes escenarios de estudio. La población infantil que participó como control presentó valores inesperados de 1-OHP lo cual, se considera importante ya que muestra los niveles de baja exposición que pueden ser encontrados en comunidades rurales de nuestro país.

La zona ladrillera presentó niveles de 1-OHP importantes en la población infantil, debe considerarse seguir estudiando este tipo de escenarios ladrilleros, ya que esta actividad es una microindustria familiar que generalmente se encuentra establecida en comunidades rurales o en la periferia de las ciudades y tienen una amplia diversidad de factores de exposición, que deben ser evaluados.

Se identificó a la población infantil de la zona expuesta al humo de leña como la población de mayor riesgo para presentar efectos en salud por la exposición a HAPs, ya que presentó los niveles mas elevados de 1-OHP en orina.

CAPITULO I

Antecedentes sobre la exposición a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

1.1 INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) forman una mezcla compleja de mas de 100 compuestos químicos orgánicos, que tienen uno o más anillos de benceno en su estructura, lo cual les proporciona propiedades fisicoquímicas que facilitan su transporte en el ambiente y su absorción en organismos vivos los cuales pueden ser susceptibles de presentar un efecto tóxico por la exposición a estos compuestos. Los HAPs se encuentran formando parte de la composición natural de combustibles fósiles (carbón mineral, carbón vegetal y petróleo), de sus productos y subproductos generados en las plantas manufactureras de coque, semicoque y gas natural (alquitrán de hulla, residuos de alquitrán de hulla, compuestos volátiles, breas, aceites) (ATSDR, 1995). Los HAPs también son generados durante la combustión incompleta de combustibles fósiles y de biomasa (leña, abono animal y residuos agrícolas) utilizados como fuentes energéticas (WHO, 2002).

Los HAPs se encuentran en la atmósfera en fase de gas (HAPs con 3 o menos anillos de benceno en su estructura, por ejemplo naftaleno y acenafteno) o adsorbidos a partículas sólidas (PM10, PM5, PM2.5, etc.) (mayores a 4 anillos de benceno, por ejemplo benzo(a) pireno) por lo que su transporte aéreo contamina otras matrices ambientales como el agua, suelo y sedimentos (Jongeneelen, 1996; Liu. y col., 2001). En el ambiente pueden ser degradados por fotólisis o por degradación microbológica en suelos su tiempo de duración en el ambiente puede ser hasta de 30 días para algunos de los HAPs. Al ser absorbidos por organismos vivos su tiempo de vida media en un rango de tiempo de horas a un máximo de tres días, por lo que no son biomagnificables (ATSDR, 1995).

La exposición a HAPs ocurre en forma de mezcla y su absorción dependerá de las características fisicoquímicas de estos compuestos (gas y partículas) y del escenario de exposición. Estos compuestos están clasificados como posibles y probables cancerígenos en animales y humanos. Cuando se encuentran como mezcla

(creosotas, emisiones diesel, emisiones de humo de leña) o algunos de ellos en forma individual (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno) (IARC, 2003; ATSDR, 1995).

Los escenarios de exposición ocupacional a HAPs ocurren a nivel mundial en la industria manufacturera de combustibles fósiles como electrodos de carbón (Omo y col., 1998) y producción de asfalto; en industrias con uso de hornos de coque como la fundición de aluminio, hierro y acero. En la industria petroquímica e incineradores industriales y municipales (Rooij, 1993; Göen, 1995; Boorgard, 1995; Kuusimäki, 2004), así como trabajos relacionados con la aplicación de asfalto para pavimentación e impermeabilización, aplicación de creosotas para la conservación de madera, entre otros. En estos escenarios ocupacionales los niveles de HAPs en aire es elevado (Angerer y col., 1997; Gündel y col., 2000; Heudorf y Angerer 2001, Jacob y Seidel, 2002).

La exposición humana a HAPs, en escenarios no ocupacionales depende de la fuente de emisión; de acuerdo al tipo de exposición, puede ser por exposición a emisiones de diesel provenientes de fuentes móviles -tránsito pesado- y fuentes fijas industriales, en ciudades con alto nivel de contaminación ambiental (Xu X y col., 1996; Calderón-Garcidueñas y col., 2003., Lionel y col., 2003; Kuusimäki y col., 2004, Ruchiwarat y col., 2005; Estrella, 2005; Xianglu y Naeher, 2005), por exposición al humo de tabaco (Heudorf y Arenger, 2001), por la preparación y el consumo de alimentos asados o ahumados (Fiala y col., 2001; Viau y col., 2002), por la quema de residuos sólidos urbanos (hules, llantas) y el humo de la quema de algunos cultivos agrícolas (Godoi y col., 2004). Una forma menos común de exposición, es la aplicación tópica de ungüentos preparados a base de creosotas para el tratamiento de lesiones dérmicas (Veenhuis y col., 2002). Por otra parte las fuentes naturales de exposición a HAPs son principalmente emisiones generadas en erupciones volcánicas o en incendios forestales (Menzie y col., 1992).

Además de lo señalado anteriormente, existen otras fuentes de exposición ambiental a HAPs derivadas del uso de biomasa (principalmente leña) como fuente de energía

para la preparación de alimentos en fogones tradicionales y usos de calefacción en viviendas rurales (WHO, 2002), la fuente de combustión se encuentra generalmente en el interior de la vivienda y la combustión incompleta de estos materiales genera HAPs, los cuales son emitidos en el interior de la vivienda (Brauer y col., 1996; McDonald y col., 2000; Liu y col., 2001; Balakrishnan y col., 2002; Myers y Maynar, 2005; Khusshk, 2005). La contaminación en la vivienda es preocupante, debido a que son las mujeres y niños pequeños quienes permanecen por largos períodos de tiempo dentro de la casa y por lo tanto la exposición a HAPs es mayor que en el resto de la familia, (Luovsky, 2002). Sin embargo, estos individuos no están del todo exentos de la exposición a estos compuestos, en las viviendas rurales indígenas de nuestro país, la vivienda es una área multifuncional en donde sus habitantes se asean, comen y duermen, incrementando así la probabilidad de presentar un riesgo de salud. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que cerca del 50% de la población mundial y el 90% de los hogares rurales utilizan biomasa como fuente de energía, lo que nos muestra el panorama de población humana expuesta a HAPs (WHO, 2002; Khusshk y col., 2005).

La inhalación de aire contaminado en espacios interiores (dentro de la vivienda, oficinas, estacionamientos, edificios, fábricas) y el aire contaminado en el exterior (ambiente), representa una importante ruta de exposición a HAPs para la absorción de HAPs por vía inhalatoria (gases y partículas respirables), tanto para la población general como para la población trabajadora. En escenarios ocupacionales además de la absorción de HAPs a través de vía inhalatoria, la absorción por vía dérmica se considera una ruta importante para los HAPs presentes en fase gaseosa (Van Rooij, 1993; Bouchard, 1999; Xianglu y Naeher, 2005).

1.2 Evaluación de la exposición a HAPs

Los HAPs al absorberse a través de diferentes vías de exposición (inhalatoria, oral o dérmica) (Brzezniński y col., 1997; Viau y col., 1999; Veenhius y col., 2002; ATSDR, 2004) y gracias a su capacidad lipofílica, se facilita su paso a través de las membranas celulares. Su metabolismo se lleva a cabo en todos los tejidos y el proceso involucra diferentes vías de transformación química. Los HAPs son metabolizados principalmente en el hígado y los pulmones mediante la activación enzimática de las isoenzimas CYP1A1 y CYP1B1 del Citocromo P450 responsables de la activación metabólica de HAPs para la formación de compuestos areno-óxidos, una vez formados estos compuestos, pueden ser transformados a dihidrodioles y posteriormente a dioles-epóxidos o transformarse a fenoles en una reacción catalizada por la enzima epóxido hidrolasa. Los fenoles a su vez son transformados a quinonas y dioles-fenol, posteriormente reaccionan covalentemente con las moléculas de glutatión y sulfatos mediante reacciones enzimáticas con glutatión-S-transferasa y sulfatasas, así forman complejos orgánicos glucurónidos o sulfónicos, que son eliminados del organismo a través de heces y la orina (Fig.3) (van Shooten y col., 1997; Bouchard y col., 1998; Kim y col., 2004; ATSDR, 2004).

A diferencia de los métodos que se han desarrollado para evaluar la exposición mediante la cuantificación de los niveles de algunos HAPs específicos (Naftaleno, Benzo(a)pireno, etc.) o de HAPs totales en matrices ambientales (aire, agua, suelo). Estos complejos o metabolitos encontrados en heces y orina, conocidos como biomarcadores de exposición, son indicadores de la dosis interna por exposición reciente a HAPs de la suma de las diferentes vías de exposición y proporcionan información acerca de la biodisponibilidad o absorción de estos contaminantes en el humano. (Jongeneelen, 1987, 1997; Kuusimäki, y col. 2004; Wang, y col., 2005)

Algunas especies reactivas formadas durante el metabolismo de los HAPs (dioles-epóxido) forman enlaces covalentes con el ADN celular, al producto de estas reacciones se le conoce como aductos de ADN, los cuales pueden encontrarse en

células de linfocitos T, en células sanguíneas o en proteínas (albúmina). La formación de estos aductos puede desarrollar efectos mutagénicos (genotoxicidad) y por lo tanto incrementar la probabilidad de desarrollar cáncer (Waiyanatha y col., 2004; Wang, y col., 2005).

1.3 Hidroxipireno como biomarcador de exposición a HAPs

Existen 14 metabolitos urinarios monohidroxilados (Tabla 1) estudiados hasta el momento como biomarcadores en diferentes escenarios de exposición a HAPs.

En la mezcla de HAPs el contenido de Pireno se encuentra presente en la mayoría de los escenarios de exposición, es encontrado entre 1-10% del total de la mezcla de HAPs (Buchet y col., 1992, Strickland y col., 1996), es metabolizado y excretado como 1-hidroxipireno (1-OHP) en orina, este metabolito es dependiente de la dosis de pireno. Diversos estudios de exposición ocupacional han mostrado que el 1-OHP es un útil y validado biomarcador de exposición ocupacional a HAPs debido a su amplio uso y a ser el primer biomarcador analizado por Jongeneelen en 1987, el 1-OHP es considerado el metabolito estándar en una amplia variedad de estudios en población general (indicador de baja exposición HAPs) y en población ocupacionalmente expuesta (indicador de altos niveles de HAPs) (Bouchard y Viau, 1999). Actualmente, el 1-OHP como otros metabolitos hidroxilados de fenantreno y antraceno están siendo probados como biomarcadores para la evaluación de la exposición a niveles de baja exposición ambiental en la población general.

Diversos estudios muestran que los niveles de 1-OHP muestran los niveles de exposición ambiental por diferentes rutas como aire, alimentos y el ambiente en el hogar, es decir el total de la exposición (Fiala y col., 2001). Su uso se debe a su relativa alta concentración en orina (se encuentra de 200 a 2000 veces más concentración que el hidroxibenzo(a)pireno) y a su fácil medición (su tiempo de vida media es de 18 h. con un rango de 6-35 horas y después de su colecta es estable a -18° C durante 1 año), lo que permite su fácil detección y su aplicabilidad. Es indicador sensible de la presencia de HAPs independientemente del tipo de fuente generadora de HAPs y de las características de exposición propias de cada país.

(Jongennelen, 1987,1996). Es considerado como un biomarcador de exposición a partículas finas (PM 2.5 μ) que son la principal fuente de exposición ambiental a HAPs (Viau y col., 1995; Joop y col., 1996; Chuang y col., 1999) y su uso como biomarcador indirecto de la mezcla de HAPs, ha sido ampliamente estudiado y justificado. En la actualidad, el 1-OHP es una herramienta para la aplicación de límites de seguridad, conocidos como Índices Biológicos de Exposición (BEIs, por sus siglas en inglés) en diferentes ambientes de exposición ocupacional en Europa (Guía Benchmark). Esta guía propone tres valores de referencia de acuerdo al percentil 95: 1) 0.24 μ mol 1-OHP/mol de Cr para individuos control no expuestos y no fumadores, 2) 0.76 μ mol1-OHP/mol de Cr para individuos control no expuestos y fumadores, 3) 1.4 μ mol1-OHP/mol de Cr Nivel de No Efecto (NOAEL, por sus siglas) nivel en el cual no hay efectos observados, 4) 1.9 μ mol1-OHP/mol de Cr (LOAEL, por sus siglas) nivel mínimo de efecto observado en trabajadores expuestos (efectos genotóxicos). A partir de este ultimo valor se han creado los límites de exposición ocupacional (OEL, por sus siglas) de HAPs, a partir de la concentración de 1-OHP en orina y las concentraciones de HAPs en aire en dos escenarios industriales, 2.3 μ mol 1-OHP/mol de Cr para trabajadores de coque y 4.9 μ mol 1-OHP/mol de Cr para trabajadores de la industria del aluminio (Jongeneelen, 2001). Estos límites han sido de gran utilidad para disminuir los niveles de exposición a HAPs, aunque se encuentren por arriba del nivel mínimo de efecto observado.

1.4 Efectos en salud asociados a la exposición de HAPs

Las mezclas de HAPs (creosotas, emisiones diesel) y algunos de los HAPs han sido clasificados como probables compuestos cancerígenos y mutagénicos en animales de laboratorio y humanos (IARC, 2003). Estudios en ratas reportan asociación con cáncer dérmico y formación de tumores (ATSDR, 2004).

Estudios con biomarcadores moleculares a través de bioensayos en bacterias (*Salmonella*), han evaluado la mutagenicidad generada por los metabolitos de HAPs, eliminados en la orina de individuos no fumadores expuestos al aire urbano y chóferes expuestos a emisiones diesel. Ensayos *in vitro* demuestran que los HAPs

alteran la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas CD34 incrementando la probabilidad para el desarrollo de carcinogénesis. (Van Grevenynghe, 2005).

Efectos citogenéticos como aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas han sido evaluados en exposición prenatal y en población adulta encontrando asociación con la exposición a HAPs (Bocksay y col., 2005; Vineis y Husgafvel-Pursiainen, 2005).

En estudios epidemiológicos de cohorte se ha demostrado una asociación significativa entre la exposición a HAPs cancerígenos [benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, [indeno (1,2,3,c ,a)pireno] (presentes en el aire urbano y en el humo de cigarro) y el retardo en el crecimiento intrauterino, se cree que esto se debe a la formación de aductos en el ADN y a que los HAPs y sus metabolitos pueden unirse con el receptor de hidrocarburos arilo, presente en el citosol (AHR, por sus siglas en inglés), acumularse en los núcleos celulares resultando en un incremento de la tasa de mutagénesis y a su vez generar actividad estrogénica y depleción de estrógenos endógenos, por lo que se considera que los HAPs causan un efecto de disrupción endocrina lo que puede incrementar la proporción de cánceres y anomalías en el sistema reproductivo (Srám y col., 2005, Kamiya y col., 2005). Se ha demostrado también que la exposición a HAPs puede afectar los niveles de inmunoglobulinas moléculas importantes en el mecanismo de defensa inmunológica (Karakaya, 1999; Jedrychowski, 2005).

Investigaciones sobre la frecuencia de mutaciones genéticas y aductos de ADN en cordón umbilical de recién nacidos sugieren daño al ADN *in útero*, aunque estos resultados no correlacionaron con las mutaciones y aductos de la madre en linfocitos periféricos, estos estudios comprueban el paso de los HAPs a través de la barrera placentaria incrementando el riesgo en salud durante el desarrollo hasta el nacimiento del individuo. La combinación de altos niveles de aductos de ADN y la exposición pasiva al humo de tabaco se han asociado con la reducción del 7% de bajo peso al nacer y un 3% con disminución en la circunferencia de la craneal del neonato (Perera, 2005).

Actualmente se ha encontrado una asociación entre mutaciones del gen TP53, acumulación de proteína p53, polimorfismos NBS1, con el desarrollo de cáncer pulmonar, en individuos expuestos a humo de tabaco y humo de combustión fósil (Lan y col., 2005, Vineis y Husgafvel-Pursiainen, 2005).

Investigaciones epidemiológicas en humanos expuestos en diferentes escenarios ocupacionales, muestran asociación en el incremento de cáncer pulmonar, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer colorectal y cáncer dérmico asociados con la exposición altos niveles de HAPs en aire y alimentos (Bofetta y col., 1997; Ronneberg y col., 1999; Cross y Sinha, 2004)

Estudios realizados en zonas urbanas, han asociado la calidad del aire solo con la exposición humana a partículas menores de $10\mu\text{m}$ (PM10) con la morbilidad y mortalidad de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (WHO, 2000; Rehwagen y col., 2005, Xianglu y Naecher , 2005, USEPA, 2005).

Actualmente ha aumentado el interés en relación a los riesgos para la salud humana asociados con partículas finas ($<2.5\ \mu\text{m}$) y ultrafinas ($<0.1\ \mu\text{m}$), ya que la evidencia indica que las partículas generadas en procesos de combustión principalmente emisiones diesel que contienen HAPs, se relacionan con una mayor capacidad para generar efectos en la salud a diferencia de las partículas no generadas en procesos de combustión. Además se ha estimado que el 50% de las emisiones presentes en áreas urbanas altamente industrializadas son generadas principalmente por el tránsito vehicular (Xianglu y Naeher, 2005; Myers y Maynard, 2005; WHO, 2005; USEPA, 2005).

Estudios sobre la contaminación en interiores por estas partículas muestran incremento de síntomas respiratorios (tos, flema, garganta, silbilencias, etc.) (Jedrychowski y col., 2005), incremento de mortalidad perinatal, cáncer nasofaríngeo y laríngeo, cataratas (Bruce y Pérez-Padilla, 2000), infecciones respiratorias agudas (IRAs) que son la causa principal de muerte en niños pequeños en países en

desarrollo, disminución de la función pulmonar, enfermedad obstructiva crónica (EOC), bronquitis crónica, neumonía, tuberculosis pulmonar y controversialmente asma (Pérez-Padilla y col., 2001; Estrella y col., 2005; Shresta y Shresta, 2005; Saha, 2005).

En nuestro país, de acuerdo a los datos del Programa Nacional de Salud 2001-2006, las enfermedades respiratorias son la causa principal de mortalidad infantil en niños menores de 5 años de edad en zonas rurales.

Los escenarios en donde existen fuentes de combustión por el uso de combustibles fósiles y biomasa, no solo generan HAPs, también se generan otros contaminantes como monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles (VOCs), dióxido de nitrógeno (NO₂), dióxido de azufre (SO₂), partículas sólidas (PM) y dioxinas (Albalak, 1999; Mc Donald, 2000; Naeher y col., 2001), por lo que evaluar el riesgo en salud en estos escenarios representa un reto, ya que la exposición se da a mezclas no solo de HAPs sino también a la mezcla compleja de diferentes contaminantes, esta dificultad se incrementa especialmente en los países en desarrollo en donde la vulnerabilidad (desnutrición) y marginación (pobreza) incrementan el riesgo de enfermedades que a su vez, representan un problema de salud pública (Khusshk y col.; WHO, 2002; 2005, Mc Donald, 2000).

La estandarización de métodos analíticos que nos permitan cuantificar los niveles de exposición y la biodisponibilidad de cada uno de estos contaminantes en la mezcla, son de gran necesidad, por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue la validación del método analítico para cuantificar la exposición a HAPs en orina en tres poblaciones con diferente riesgo.

CAPITULO II

Justificación, Hipótesis y Objetivos

2.1 JUSTIFICACIÓN

En México la exposición a hidrocarburos totales, ha sido evaluada en matrices ambientales (aire, agua, sedimento y elutriados), en diversos sitios contaminados por fuentes de combustión como fuentes móviles e industriales de las zonas metropolitanas, pertenecientes al programa de calidad del aire IMECA (COFEPRIS, 2002) o en algunos estados con actividad petrolera (Sánchez, 1994). Sin embargo, se carece de estudios que evalúen específicamente el riesgo por la presencia de HAPs. Existen estudios que evalúan el riesgo a la salud mediante la metodología de evaluación de riesgo de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) mediante cálculos matemáticos (Sánchez, 1994) y estudios en biota marina expuesta a estos contaminantes (Zapata-Pérez, 2004). Sin embargo, la evaluación de la contaminación por HAPs en población humana es un reto, este problema resulta complicado debido a que la exposición se da a mezclas no solo de HAPs, sino de una variedad amplia de contaminantes generados en los procesos de combustión (CO₂, NO₂, SO₂, dioxinas, etc.).

Con base en estudios de la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) y de un estudio realizado en la Zona Metropolitana del Valle de México en 1999, se estima que entre los principales compuestos tóxicos contaminantes que contribuyen en el desarrollo de cáncer se encuentran la materia orgánica policíclica, el 1,3-butadieno, el formaldehído, el benceno, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las emisiones que se generan por el uso del diesel (COFEPRIS, 2002). A pesar de ello no existe ningún estudio en nuestro país, que evalúe específicamente el riesgo de exposición a HAPs en población humana en México.

En México 3 millones 694 mil viviendas correspondientes al 17% del total de las viviendas en el país usan leña como fuente de energía, constituyendo cerca del 18% del total de la población nacional expuesta a esta fuente de HAPs. En el estado de San Luis Potosí, aproximadamente el 32 % de la población utiliza biomasa como

combustible para la cocción de alimentos, calefacción, entre otros. (COFEPRIS, 2002) (Fig.1).

En nuestro país, además del uso de leña, existen otras fuentes fijas de exposición de origen microindustrial que contribuyen a la de contaminación atmosférica, estas fuentes son la alfarería y la fabricación de ladrillos. Para generar energía en los hornos ladrilleros y en hornos alfareros, los trabajadores utilizan diversos materiales que se encuentran a su alcance y a bajo costo como residuos sólidos domésticos, biomasa y residuos industriales (plásticos, madera, aceites usados, llantas de automóviles, fibras sintéticas, entre otros) (COFEPRIS, 2002).

En las comunidades y ciudades en donde se encuentran estas microindustrias, es común que los hornos se localicen dentro de los patios de las viviendas, de ahí que la exposición es de tipo ocupacional y ambiental. En las comunidades rurales dedicadas a la actividad ladrillera, sus habitantes se exponen también al humo de leña que usan como combustible en el hogar. En las ciudades las emisiones de los hornos, contribuyen al incremento de la contaminación atmosférica exponiendo así a la población general.

En México, se han reportado 15 entidades federativas con actividad ladrillera (Fig.2). Pese a que no existe un censo global del número de ladrilleras en la República Mexicana, en algunos lugares del país, existen más de 300 hornos ladrilleros (Corral, 2005). Las entidades federativas con actividad alfarera registradas hasta el momento son 25 (Fig. 2). Ambas microindustrias son familiares por lo tanto niños y adultos trabajan en la elaboración de ladrillos y piezas de alfarería durante jornadas de 10-24 horas por semana, por lo cual estas labores se consideran un problema ambiental, social y de salud (COFEPRIS, 2002).

Otros escenarios de exposición no estudiados en México, son los sitios contaminados por la industria petroquímica, escenarios rurales con uso de biomasa en donde los niños pequeños y sus madres se encuentran mayor tiempo expuestos dentro de su vivienda y quema en zonas agrícolas, entre otros.

El sector infantil se encuentra expuesto en estos escenarios, los niños son individuos en desarrollo que pueden tener una mayor vulnerabilidad para presentar riesgos en salud, por lo que es importante evaluar su exposición en sitios contaminados.

Debido a la escasa información en la identificación de fuentes generadoras de HAPs en diversos escenarios de riesgo, tanto rurales como urbanos de nuestro país y a la falta de estudios que evalúen la exposición a la mezcla de HAPs, en la población residente de estos escenarios, consideramos llevar a cabo este trabajo, el cual representa el inicio de un proyecto que tiene por objetivo, evaluar el riesgo en salud por exposición a fuentes generadoras de HAPs y corresponde a este trabajo la parte inicial de este proyecto, que es identificar poblaciones rurales expuestas a HAPs a través de la cuantificación de 1-OHP como biomarcador de exposición, principalmente en la población infantil ya que consideramos es el sector de la población con una mayor susceptibilidad para presentar efectos en la salud.

2.2 HIPOTESIS

La población infantil expuesta continuamente a emisiones provenientes de fuentes importantes de combustión, presentarán niveles de 1-OHP en orina mayores que la población no expuesta.

2.3 Objetivo general

Identificar comunidades de alto riesgo expuestas a HAPs a través de la cuantificación de 1-OHP en orina como marcador de exposición.

Objetivos específicos

- 1) Validar el método analítico para la determinación y cuantificación de 1-OHP en orina.
- 2) Cuantificar los niveles de 1-OHP en muestras de orina de niños residentes de tres comunidades: zona control, zona ladrillera y zona con uso de leña.

CAPITULO III

Metodología de muestreo

3.1 Zonas de Estudio

Santo Domingo

Sitio que se localiza en la zona centro, está situado en las coordenadas geográficas 22° 05'55'' latitud norte y 100° 44' 45'' longitud oeste, con una altura media de 1970 msnm. y pertenece al municipio de Villa de Zaragoza, San Luis Potosí.

Cuenta con 330 habitantes, 50% son hombres, el 49% son mujeres, el 11% corresponde a la población infantil de 0 - 4 años de edad y el 86% de 5 años y más. El 13.5 % de la población de 15 años o más es analfabeta.

Aproximadamente el 31% de la población es económicamente activa (PEA), el 7% se dedica al sector primario, el 33% al sector secundario y el 53% al sector terciario. La mayor parte de la población se transporta a la capital del estado para trabajos temporales. De acuerdo al diagnóstico del Consejo Nacional de Población (CONAPO) el grado de marginación es medio en esta localidad y el 41% de las viviendas utiliza gas como combustible y el 23% leña. Un 67% cuenta con servicios de agua y energía eléctrica (CONAPO, 2000).

Laguna de San Vicente

Localidad situada en la zona centro-sur del estado, en las coordenadas geográficas 21° 56'48'' latitud norte y 100° 51'37'' longitud oeste, con una altura media de 1820 msnm., localidad perteneciente al municipio de Villa de Reyes, San Luis Potosí.

Cuenta con 2749 habitantes de los cuales el 48% son hombres, el 52% son mujeres, el 12% en población infantil de 0 - 4 años de edad y el 87% población de 5 años y más. De acuerdo a la PEA el 8% se dedica al sector primario, 67% corresponde al sector secundario y el 22 % al sector terciario.

El 8.7% es analfabeta y de acuerdo al total de viviendas el 65% utiliza gas como combustible y el 35% aun utiliza leña. El 6.1% carece de servicios de luz eléctrica y agua; en la comunidad no existe un sistema de drenaje adecuado. De acuerdo a CONAPO el grado de marginación de esta localidad es alto (CONAPO, 2000).

La fabricación de ladrillos es su principal actividad económica, las ladrilleras son micro industrias familiares en donde participan niños, jóvenes y adultos, existen mas

de 30 hornos ladrilleros con capacidad de 3000 a 6000 ladrillos se encuentran en funcionamiento de 2 a 4 veces por mes (cocción de ladrillo), se utilizan como combustibles residuos industriales, como hules, plásticos, aceite usado, madera, llantas y basura de todo tipo. El 85% de la población infantil encuestada trabaja en la ladrillera en el acarreo de material, amasado de la mezcla y elaboración de los bloques de arcilla. Los hornos ladrilleros se encuentran en el patio de las casas a una distancia de 100 m aproximadamente o a las orillas de la localidad, precisamente estos últimos se encuentran cercanos a la escuela primaria y al jardín de niños.

Tancuime

Sitio que se localiza en la zona huasteca, está situado en las coordenadas geográficas 21° 36'05'' latitud norte y 99° 00'37'' longitud oeste, con una altura media de 100 msnm, esta localidad pertenece al municipio de Aquismón, San Luis Potosí. Cuenta con 1453 habitantes, 51% son hombres y el 49% son mujeres, el 15% representa la población infantil de 0-4 años de edad y el 84% de 5 años o más. El 98 % de la población mayor de 5 años de edad es indígena (Tenek) y el 24% de 15 años o más es analfabeta. De acuerdo a la población económicamente activa, el 57% forma parte del sector primario, 18% al sector secundario y el 24% al sector terciario. El grado de marginación de esta localidad es alto (CONAPO, 2000).

Con respecto al total de viviendas habitadas el 96% utiliza leña como combustible en el hogar (fogones tradicionales tipo fogata) y el 53% carece de servicios de agua potable, electricidad y drenaje (Fig. 4). La mayoría de las viviendas indígenas constan de una pieza con piso de tierra, donde realizan varias actividades como cocinar alimentos, dormir y es un área de juego para los niños, por lo que la exposición a las emisiones del fogón es continua.

3.2 Selección de la Población

El muestreo se realizó en tres comunidades rurales. En dos de las comunidades se visitaron las escuelas de nivel primaria, se informó a los maestros y padres de familia sobre las características del estudio. A los padres que aceptaron que sus hijos

participaran en el estudio se les solicitó su aceptación voluntaria de manera escrita. Se incluyeron niños que vivieran en la comunidad desde su nacimiento. En las tres comunidades la población se seleccionó por la aplicación de cuestionario donde se evaluaron factores de riesgo (tabaquismo pasivo, uso de leña en el hogar, consumo de alimentos asados, síntomas respiratorios), nivel socioeconómico y actividad económica.

3.3 Muestreo Biológico

Santo Domingo. Se seleccionaron 17 niños de 7 a 11 años de edad de la escuela primaria “Librado Rivera”, uno de los criterios de inclusión fue que no utilizaran leña como fuente de energía en sus casas. Para la colecta de muestra se citó a los niños con la primera muestra de orina de la mañana.

Laguna de San Vicente. Se seleccionaron 35 niños de 7 a 13 años de edad de la escuela primaria “Emiliano Zapata”. Para la colecta de la muestra, se citó a los niños con la primera muestra de orina de la mañana.

Tancuime. Se realizó una reunión en el centro de salud de la comunidad y se informó a los padres de familia sobre las características del estudio con ayuda de un traductor de lengua tenek, la colecta de muestras de orina se realizó en cada una de las 6 familias participantes, la edad de los 20 participantes fue de 7 a 18 años de edad. En todas las familias participantes usaban leña como combustible.

Todas las muestras de orina, se colectaron en recipientes de plástico nuevos y estériles de 100 ml, previamente etiquetados y se resguardaron en hieleras durante su transporte al laboratorio. Ya en el laboratorio las muestras fueron filtradas a través de membranas milipore 45µm y se alicuotaron en volúmenes de 10ml en tubos nuevos de polipropileno en donde fueron almacenados a -20° C hasta su análisis.

CAPITULO IV

Metodología y Validación del Método Analítico

4.1 Estandarización del Método Analítico.

Equipo

El análisis de las muestras se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) HP 1100 series (Hewlett Packard) acoplado a un detector de fluorescencia G1321A con precolumna ZORBAX SB-C18 de 4.6 x 12.5 mm de diámetro interno y 5 μ m de espesor de película, columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 4.6 mm x 250 mm diámetro interno x 5 μ m de espesor de película y lámpara de xenón.

Condiciones de trabajo

De acuerdo con los datos reportados en la literatura sobre el método analítico para la determinación de 1-OHP (Jongennelen, 1987; Kuusimäki, 2004), se realizaron varias pruebas inyectando el estándar de 1-OHP en una concentración de 240 nmol/L para verificar los cambios en la elusión y recobro de este analito. Para la fase móvil, se trabajaron diferentes proporciones de acetonitrilo y de metanol, se probaron las longitudes de onda reportadas, se trabajaron diversas velocidades de flujo y diferentes condiciones de temperatura. Para la identificación de 1-OHP se consideró el tiempo de retención de 4.7 min para el estándar en metanol. El propósito de estas pruebas fue la obtención de las condiciones adecuadas de trabajo de acuerdo a la resolución del pico de 1- OHP en el cromatógrafo (tabla2).

Las condiciones cromatográficas lineales para el desarrollo del método analítico fueron las siguientes: Fase móvil: 88 % agua y 12% metanol, flujo: 1ml/min., temperatura: 40° C, tiempo de corrida: 7 min., presión: 76 psi y longitudes de onda: $\lambda_{\text{excitación}}=242$ nm, $\lambda_{\text{emisión}}=390$ nm.

Tabla 2. Modificaciones de las condiciones cromatográficas

| Fase móvil % | Longitud de onda de excitación y emisión (nm) | Flujo (ml/min) | Temperatura (°C) |
|--|---|-------------------|-----------------------|
| Metanol:Agua 80:20 | 242-388 | 1 | 24 |
| Acetonitrilo:Agua 80:20 | 242-390 | 0.8 | 40 |
| Metanol:Agua 88:12 Ac. Ascórbico | 242-392 | 0.6 | 40 |
| Metanol:Agua 88:12 Ac. Ascórbico | 242-390 | 1 | 40 |

4.2 Procedimiento de Extracción

Condiciones de extracción

El proceso de extracción se realizó en columnas Octadecil C18 polar plus fase sólida-líquido con un volumen de 6ml y 1g de adsorbente (J.T. Backer).

El proceso de extracción consiste en la activación, acondicionamiento, paso de la muestra, lavados y extracción del analito (1-OHP). La retención del analito se lleva a cabo de acuerdo a las características de polaridad del mismo y del adsorbente presente en las columnas. En nuestro caso con la finalidad de tener la menor pérdida de analito (1-OHP) posible y disminuir los efectos de matriz (orina), que interfieren en el análisis de estándares y muestras, se realizaron diferentes pruebas en los pasos mencionados anteriormente sobre el acondicionamiento y lavado de las columnas de extracción (tabla 3).

Se realizó el siguiente procedimiento para desarrollar la extracción de 1-OHP:

a) Se activaron las columnas con un volumen de (5 x 2) ml metanol (100%) y se eluyó este volumen sin flujo en la cámara de vacío.

- b) Para el acondicionamiento se utilizó un volumen de (5 x 2) ml de solución 1:1 de agua desionizada y solución amortiguadora de acetatos con 2% de metanol, se eluyó con un flujo menor a 2.5 psi en la cámara de vacío.
- c) Se realizó el paso de la muestra la cual fue adicionada previamente con 0.1% metanol (según el volumen de muestra), sin flujo al vacío.
- d) En el lavado se utilizó un volumen de (5 x 2) ml de agua desionizada con un flujo de 2.5 psi en cámara de vacío.
- e) El segundo lavado se dividió en dos partes, en la primera parte se lavó con un volumen de (3.5 x 2) ml de acetronitrilo al 30% y la segunda parte con un volumen de (3.5 x 2) ml de metanol al 30%, aplicando 2.5 psi de flujo en la cámara de vacío.
- f) Para el secado, se aplicó un flujo menor de 5 psi en la cámara de vacío durante un tiempo de 1 min. Posteriormente con el propósito de eliminar la cantidad de agua presente en las columnas, estas fueron centrifugadas durante 5 min. a 2500 r.p.m.
- g) Para la elusión del analito se utilizó un volumen de (3 x 2) ml de metanol en 1% ácido acético glacial, se eluyó este volumen sin uso de vacío. El metanol se aplicó en dos partes con el propósito de incrementar la eficiencia en la elusión. Al finalizar se aplicó flujo de 2.5 psi hasta secar completamente las columnas.

Tabla 3. Modificaciones en las condiciones de extracción de 1-OHP

| Acondicionamiento 1 | Acondicionamiento 2 | Muestra | Lavado 1 | Lavado 2 | Elusión (ml) |
|------------------------|--|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Metanol | Agua | ----- | Agua | ----- | 5 |
| Metanol | Agua: Soln. Amortiguadora | ----- | Agua | Metanol 15 % | 3x3 |
| Metanol | Agua: Soln. Amortiguadora metanol 5% | Metanol 0.1% | Agua | Metanol 25 % | 3x3 |
| Metanol | Agua: Soln. Amortiguadora metanol 2% | Metanol 0.1% | Agua | Metanol 30 % | 3x2 |

Curva de calibración

Estándares: Se preparó un estándar de 240 nM de 1-OHP en metanol y ácido ascórbico (1mg/ml) a partir del estándar de referencia 1-OHP 98% (ALDRICH) en matraces aforados, el estándar de 240 nM de 1-OHP se utilizó para la preparación de los estándares en orina para la curva de calibración (anexo 1).

Se preparó un “pool” de orina para la preparación de la curva de calibración, se colectaron orinas durante 3 días de niños no expuestos, se mezclaron las orinas, se centrifugaron y filtraron con membrana milipore 0.45 μm . Los estándares de la curva de calibración fueron preparados con este pool y con los volúmenes calculados para cada punto de la curva (ver tabla siguiente).

Tabla 4. Curva de calibración estándar de 1-OHP en orina.

| Concentración del estándar (nmol/L) | Volumen de solución stock de 240 nmol/L (μl) | Volumen final de aforo con orina (ml) |
|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| 7.2 | 30 | 10 |
| 14.4 | 60 | 10 |
| 24 | 100 | 10 |
| 48 | 200 | 10 |
| 60 | 250 | 10 |

4.3 Validación del método analítico

Especificidad

Para determinar el analito de interés dentro en una mezcla de diferentes compuestos (orina), primero se preparó e inyectó el estándar de referencia para 1-OHP 98% (ALDRICH) en metanol, para asegurarnos que la respuesta a una medición fuera

solo originada por el analito. En un inicio se inyectó una concentración de 240 nmol/L en metanol para detectar la señal de 1-OHP y se midió el tiempo de retención el cual fue de 4.6 min. Posteriormente se prepararon concentraciones de 0.48 – 6.0 nmol/L del estándar de referencia en metanol para confirmar el tiempo de retención (Fig. 5). Posteriormente se prepararon estándares en orina en donde el tiempo de retención varió ligeramente de 4.6 a 4.7 min., debido a que no fue lo mismo inyectar un solo compuesto en solvente que inyectar una muestra problema debido a que en la muestra se tiene una mezcla de compuestos e impurezas que pueden mover ligeramente el tiempo de retención por lo cual fue importante considerar esta variación (Fig. 6).

Linealidad

Para verificar que la Ley de Lambert y Beer se cumpliera es decir, asegurar que la respuesta fuera proporcional a la concentración de la sustancia dentro de intervalo determinado, se calculó el coeficiente de correlación el cual de acuerdo a los criterios de linealidad debe ser ≥ 0.99 .

Linealidad del sistema.

Con el propósito de evaluar la reproducibilidad del analista se realizaron 6 curvas de calibración en metanol, cada una por triplicado, en un período de 1 semana de trabajo, donde podemos observar la linealidad en nuestros resultados (tabla 5).

Se realizó una comparación entre la curva de 1-OHP en solvente con respecto a la curva de 1-OHP en la matriz (orina) de acuerdo a las pendientes obtenidas. El Intervalo lineal fue de 7.2 a 60 nmol/L de 1-OHP (Fig.7). Debido a la diferencia entre las pendientes se eligió preparar los estándares de la curva en orina ya que es de mayor utilidad para la interpolación de las muestras problema, debido a su similitud en el efecto de matriz, por lo que se decidió trabajar con curvas de calibración en orina para la validación y cuantificación de 1-OHP en las muestras problema.

Tabla 5. Linealidad instrumental

| Curva promedio | r | m | b |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| Día 1 | 0.9995 | 3.829 | 1.414 |
| Día 2 | 0.9992 | 4.089 | 1.135 |
| Día 3 | 0.9995 | 4.016 | 1.863 |
| Día 4 | 0.9993 | 3.729 | 1.586 |
| Día 5 | 0.9993 | 3.817 | 1.183 |
| Día 6 | 0.9988 | 3.545 | 2.996 |

Linealidad del método.

Se realizaron 6 curvas de calibración, cada una por triplicado, en un período de 3 semanas de trabajo. En la tabla se muestran los resultados de: coeficiente de correlación (r), pendiente (m) e intercepto al origen (b) (Tabla 6).

Como puede observarse las curvas de calibración para 1-OHP son lineales ya que todos los coeficientes de correlación fueron ≥ 0.99 cumpliendo con el criterio de linealidad. Debido a la variación que se observa en el intercepto se preparó curva de calibración en cada procesamiento de las muestras.

Tabla 6. Linealidad del método.

| Día 1 | | | |
|-------|----------|---------|---------|
| curva | Semana 1 | | |
| r | 0.9955 | 0.9995 | 0.9978 |
| m | 2.3843 | 2.1956 | 2.4522 |
| b | -8.5460 | -4.3288 | -7.5331 |
| Día 2 | | | |
| curva | 1 | 2 | 3 |
| r | 0.9989 | 0.9988 | 0.9977 |
| m | 2.4335 | 2.3729 | 2.5074 |
| b | -9.3374 | -7.4572 | -9.1298 |
| Día 3 | | | |
| curva | Semana 2 | | |
| r | 0.9990 | 0.9904 | 9980 |
| m | 1.6417 | 1.7268 | 1.6697 |
| b | -1.5337 | -1.9499 | -1.2948 |
| Día 4 | | | |
| curva | 1 | 2 | 3 |
| r | 0.9988 | 0.9990 | 0.9997 |
| m | 1.7229 | 1.7239 | 1.7675 |
| b | 4.6770 | 4.6412 | 4.0021 |
| Día 5 | | | |
| curva | Semana 3 | | |
| r | 0.9990 | 0.9981 | 0.9920 |
| m | 1.7283 | 1.8327 | 1.8655 |
| b | 3.6062 | 0.6989 | 0.8310 |
| Día 6 | | | |
| curva | 1 | 2 | 3 |
| r | 0.9989 | 0.9990 | 0.9982 |
| m | 1.8464 | 1.7422 | 1.7403 |
| b | 0.2564 | 2.6179 | 2.5570 |

Exactitud

Para conocer la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor de referencia, se procesaron estándares certificados de 1OHP en orina de baja y media concentración Clin-Cal-Recipe 50013 (9.1nmol/L) y Clin-Cal-Recipe 50014 (32.5 nmol/L) en cada lote de muestras, se obtuvo una exactitud de 101 y 105 % respectivamente. Para la exactitud del método cromatográfico el porcentaje recomendado es del 50-120% (AOAC/FAO/IAEPA/IUPAC, 1999) (Tabla 7).

Tabla 7. Exactitud

| Estándar certificado | Media (nmol/L) | % recobro | % Exactitud |
|-----------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| Clin-Cal-Recipe 50013 | 9.1 | 99 | 101 |
| Clin-Cal-Recipe 50014 | 32.5 | 99 | 105 |

PrecisiónRepetibilidad.

Para observar la concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente, la guía Eurachem (Europa Analytical Chemistry) indica que para la precisión del equipo, el análisis debe realizarse por sextuplicado de una misma solución de referencia, con un criterio de aceptación de CV (coeficiente de variación) $\leq 1.5\%$, para ello se preparó un estándar de 4.8 nmol/L de 1-OHP en metanol y se inyectó repetidamente en 6 ocasiones, el resultado del CV fue de 0.76% menor al criterio de aceptación (tabla 8), lo que indica que el sistema trabaja con precisión.

Tabla 8. Precisión instrumental

| Lectura (4.8 nmol/L 1-OHP) | Repuesta |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1 | 29.6 |
| 2 | 29.6 |
| 3 | 29.3 |
| 4 | 29.3 |
| 5 | 29.1 |
| 6 | 29.1 |
| Media | 29.3 |
| D.E* | 0.22 |
| % CV** | 0.76 |

Repetibilidad del método

Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, instrumentos, laboratorio) y forman parte fundamental de la precisión. Por lo tanto, se realizaron 6 mediciones repetidas de una muestra en orina con una concentración conocida de 15 nmol/L de 1-OHP, esta muestra fue procesada en 6 ocasiones en un solo día, bajo las mismas condiciones de trabajo. El valor calculado con la media y la desviación estándar del CV fue del 6%, este valor esta por debajo del valor recomendado para esta concentración que es de 14% (Horowitz, 1982) por lo que se concluyó que el método tiene una precisión aceptable.

Reproducibilidad.

Este parámetro fue calculado con el promedio de las pendientes obtenidas de las seis curvas de calibración estándar en orina, realizadas en seis diferentes días. El CV calculado con la media (1.9640) y la desviación estándar (0.3376) fue de 17%, el método es reproducible ya que el valor del CV es menor al valor recomendado para este parámetro el cual es del 20% (Horowitz, 1982).

Límite de detección y límite de cuantificación del método.

a) Límite de detección (LDD): Mínima concentración de 1-OHP que puede ser detectada.

b) Límite de cuantificación (LC): La menor concentración de 1-OHP en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

En estos dos parámetros fueron calculados por el método geométrico (Miller y Miller, 2000), los datos que se pueden observar en la siguiente tabla:

Límite de detección y límite de cuantificación de 1-OHP

| LDD (IC 95%) (nmol/L) | LC (IC 95%) (nmol/L) |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 0.1 (0.5 – 0.7) | 0.3 (0.3 – 0.9) |

CAPITULO V

Análisis de muestras y Resultados

Cuantificación de 1-OHP

La detección con fluorescencia es utilizada para la cuantificación de sustancias con fluorescencia nativa como es el caso de 1-OHP, se usan dos longitudes de onda, una de excitación y una de emisión. Al excitar la muestra por medio del haz de luz a una dada longitud de onda, donde varios componentes de la muestra podrían absorber energía, pero pocos emitirán a la longitud de onda elegida para la emisión. (Quatrochi, 1992).

Pretratamiento de estándares y muestras.

Las muestras de orina al llegar al laboratorio fueron centrifugadas durante 15 min. (Centrifuga SOLBAT) a 3000 r.p.m, para descartar que el 1-OHP estuviera unido a los cristales y o partículas presentes en las muestras de orina, se realizaron varias pruebas con anticipación con algunas muestras que no fueron centrifugadas ni filtradas y fueron procesadas de la misma forma que el resto de las muestras, se obtuvo el mismo recobro. Las muestras centrifugadas se filtraron en sistema de vacío (matraz PIREX-milipore) con membrana milipore de 45 μ m. El filtrado se distribuyó en alícuotas de 10 ml en tubos cónicos de plástico de 50 ml (Corning) y fueron almacenados a -20° C hasta su análisis (REVCO Technologies).

5.1 Tratamiento de muestras y estándares.

Hidrólisis enzimática

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se les añadió un volumen de 10 ml de solución amortiguadora de acetatos pH=5.0 (anexo 1), se mezclaron en vortex durante 1min. Enseguida se añadió un volumen de 30 μ l de enzima β -glucuronidasa/arilsulfatasa (Helix Pomatia tipo H-2/98000U/SIGMA), a los estándares para la curva de calibración no se les añadió el volumen de enzima. Las muestras y estándares se incubaron durante la noche por 16 hrs a 37° C con agitación constante a 100 r.p.m. (agitador LW Scientific, 2100A).

Extracción

Después de la incubación, las muestras y estándares se centrifugaron en los tubos cónicos de 50ml, durante 15 min. a 3000 r.p.m. posteriormente se añadió 0.1% de metanol antes de pasar las muestras por las columnas de extracción previamente activadas y acondicionadas mediante las condiciones de extracción explicadas en la sección 4.2. El solvente con el analito obtenido en la extracción se evaporó con flujo de nitrógeno durante 45 min. a 40° C (Zymark), el concentrado se aforó con metanol en matraces de 1ml, posteriormente se filtró con disco milipore 45 µm, se recibió en viales ámbar silanizados los cuales se cubrieron inmediatamente con sus septas y se cuantificaron por HPLC.

5.2 Análisis estadístico

Se creó una base datos con la información que se obtuvo en la aplicación de cuestionarios adecuados a cada comunidad (anexo 3) y con los valores de 1-OHP cuantificados por HPLC. Las variables continuas fueron los niveles de 1-OHP µmol/mol de Cr, edad, talla para la edad, peso para la talla, escolaridad del padre, escolaridad de la madre, tiempo de residencia y horas de trabajo en la ladrillera. Se clasificaron como variables categóricas; zona de estudio, género, familia, actividad del padre, tipo de combustible utilizado en el hogar, exposición al humo de tabaco, consumo de alimentos asados o ahumados, niño trabajador en la ladrillera, ubicación de la ladrillera, tipo de material que se quema en el horno ladrillero, número que quemas, síntomas respiratorios, hábitos de higiene y nivel socioeconómico.

Se aplicaron las pruebas estadísticas de normalidad para variables continuas en la población total y para la población por cada una de las zonas (medidas de tendencia central: media, mediana, sesgo, kurtosis y prueba de normalidad Shapiro Wilks). Los niveles de 1-OHP no presentaron distribución normal para la comunidad de Laguna de San Vicente (zona 2), por lo que se realizó una transformación logarítmica de los datos y se aplicó nuevamente la prueba de normalidad, los datos transformados no presentaron una distribución normal por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas para el análisis posterior de los datos.

Se realizó una prueba de Kruskal Wallis H., con esta prueba no paramétrica se compararon las medianas de los niveles de 1-OHP en las tres grupos de estudio (zona 1= Santo Domingo, zona 2= Laguna de San Vicente, zona 3= Tancuime).

Para las variables categóricas de más de dos categorías se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para conocer si existía diferencia significativa en los niveles de 1-OHP por categoría y por zona (niveles de 1-OHP por tipo de combustible utilizado, niveles de 1-OHP por edad categorizada, 1-OHP por familias para la zona 3), para las variables de dos categorías se aplicó prueba de Wilcoxon W para evaluar si existía alguna diferencia entre dos poblaciones en cada una de las zonas (niveles de 1-OHP por sexo, 1-OHP por actividad ladrillera, 1-OHP por exposición al humo de tabaco). Se utilizaron frecuencias simples para calcular el porcentaje de la población con niveles superiores a los límites de referencia aplicables a diferentes grados de exposición. Para el análisis se utilizó el programa estadístico SPSS versión 10.0.1.

5.3 Evaluación nutricional y nivel socioeconómico.

Se obtuvieron datos de talla, peso y edad. A partir de estos datos, se calcularon los parámetros de talla para la edad, peso para la edad y peso para la talla como indicadores de desnutrición crónica y aguda respectivamente. Estos parámetros se calcularon con el programa Epi Info versión 6.0, el cual utiliza como referencia las tablas del Centro Nacional de Estadística de Salud de los Estados Unidos (NCHS) (Dibley M.J. y col., 1987), que son las recomendadas por el CDC (Centro de control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos) y por la OMS, (Anexo 2). Los valores obtenidos fueron transformados a unidades z, debido a que se utilizaron las puntuaciones de menos de 2 DE como punto de corte para clasificar a los niños como desnutridos (talla o peso bajos para la edad y peso para la talla) y más de 2 DE del z de peso para la talla para clasificar a los niños con sobrepeso, estos puntos de corte son utilizados por la Encuesta Nacional de Nutrición de México (1999).

El nivel socioeconómico (NSE) se calculó con el cuestionario de evaluación del Comité de Niveles Socioeconómicos de la Asociación Mexicana de Agencias de Investigación de Mercados y Opinión Pública, A.C. (AMAI, 2004) (Anexo 3)

5.4 RESULTADOS

En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos de los datos sociodemográficos de las tres comunidades de estudio. La proporción de niños y niñas participantes en el estudio fue aproximadamente del 50% en ambos sexos. La edad promedio en las tres comunidades fue de 7 a 9 años, el tiempo de residencia en las tres comunidades fue desde su nacimiento. El nivel socioeconómico (SE) de las comunidades obtenido por cuestionario mostró que en la comunidad de Sto. Domingo, el 80% de la población tuvo un nivel bajo/alto y un nivel menor pero no menos importante del 13% tuvo un nivel bajo, en la comunidad de Laguna de San Vicente el 72% de la población corresponde al nivel bajo/alto y el 19% al nivel bajo. En la comunidad de Tancuime el 100% de la población presentó un nivel socioeconómico de ingreso mínimo. En esta tabla se presenta también el porcentaje de la población expuesto a factores contundentes en la exposición a HAPs como tabaquismo pasivo, porcentaje de la población con uso leña como combustible en el hogar y en el caso de la comunidad ladrillera el porcentaje de niños trabajadores expuestos a las emisiones de los hornos por esta actividad. El 86% de la población infantil encuestada, contestó trabajar en las ladrilleras con un promedio de 2 horas por día con un máximo de 4 horas.

En la tabla 10, se presentan las mediciones antropométricas con las cuales se determinaron los niveles de desnutrición, los parámetros dados por la Encuesta Nacional de Salud indica desnutrición aguda para valores menores a 2 desviaciones estándar (DE), en este parámetro Laguna de San Vicente presentó el porcentaje mayor del 14% y la comunidad de Tancuime presentó el 9%. Para el parámetro de desnutrición crónica se indica para valores menores a 2 DE, en este parámetro la comunidad de Tancuime presentó el mayor porcentaje con un 18% y en la

comunidad de Sto. Domingo un porcentaje del 12%. El parámetro de obesidad toma en cuenta valores mayores a 2 DE, Laguna de San Vicente presenta que el 25 % de la población infantil participante se encuentra dentro de este parámetro.

En la Fig. 8, se muestra la diferencia estadística encontrada (Kruskal Wallis $p < 0.01$) entre los valores de las medianas de 1-OHP en las zonas de estudio; El valor de la mediana de 1-OHP fue de $0.22 \pm 0.16 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ (Santo Domingo-Control), $0.55 \pm 0.42 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ (Laguna de San Vicente-Ladrillera) y $2.1 \pm 1.2 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ (Tancuime- Humo de leña).

En la Fig. 9 se muestran los niveles de 1-OHP por zonas de estudio de acuerdo a la exposición pasiva al humo de tabaco. No se encontró diferencia estadística entre los niveles de 1-OHP de los niños que estuvieron expuestos a tabaquismo pasivo y entre los niños no expuestos, en las comunidades de Santo Domingo y Laguna de San Vicente, sin embargo en la comunidad de Tancuime se encontró una diferencia estadística entre los niños expuestos (mediana de $1.3 \pm 0.69 \mu\text{mol/mol de Cr}$) el valor de los niños no expuestos (mediana de $2.6 \pm 1.19 \mu\text{mol/mol de Cr}$) (Mann Whitney, $p < 0.05$).

En la Figura 10, se presentan los niveles de 1-OHP en la población de acuerdo al tipo de combustible que utilizan como fuente de energía en sus viviendas, uso de leña, uso de gas o el uso de ambas. En la comunidad de Laguna de San Vicente existe una parte de la población que utilizan ambos combustibles (leña y gas) de manera alternada y otra parte de la población solo utiliza gas, no se encontró diferencia estadística en los valores de 1-OHP en estos sectores de la población. En la comunidad de Sto. Domingo en los hogares de los niños seleccionados solo utilizaban gas y en la comunidad de Tancuime la población utilizaban exclusivamente leña. Sin clasificar por zona de estudio, es decir con la población general y clasificando por tipo de combustible, se compararon los niveles de 1-OHP de la población y se encontró diferencia significativa (Kruskal Wallis $p < 0.01$). Entre los niveles de 1-OHP de sector que usa ambos combustibles y el sector que solo usa

gas también se encontró diferencia estadística (Mann Whitney U $p < 0.01$) los niveles de 1-OHP para los niños expuestos a ambos combustibles la mediana fue de $0.55 \pm 0.45 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ ($0.04 - 2.25 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$), para los niños en donde solo usaban gas fue de $0.25 \pm 0.81 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ ($0.01 - 0.81 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$). Los niños expuestos a leña únicamente, tuvieron una mediana de $1.80 \pm 1.26 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ ($0.22 - 4.55 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$). No se encontró diferencia estadística en Laguna de San Vicente, entre los niveles de 1-OHP de los niños que vivían en hogares donde se usan ambos combustibles y los niños que vivían en hogares que solo utilizan gas.

Los niveles más elevados de 1-OHP por uso de leña fue la comunidad de Tancuime.

Con respecto a la actividad ladrillera en la Figura 11, se la gráfica con los valores promedio de 1-OHP por cada tipo de combustible utilizado en los hornos ladrilleros de Laguna de San Vicente, no se encontró diferencia estadística. El nivel de 1-OHP en niños que trabajan en las ladrilleras fue de $0.58 \pm 0.44 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$ y los niños no trabajadores fue $0.34 \pm 0.22 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$, no se encontró diferencia estadística aunque hay que aclarar que existe una diferencia amplia en el tamaño de muestra de estos sectores de la población ($n=30$ Vs $n=5$), tampoco se encontró diferencia en los niveles de 1-OHP con respecto a la distancia del horno ladrillero.

En la Figura 12 se presentan los niveles de 1-OHP por rango de edad, según zonas de estudio. Los niños de menor edad (< 6 años) de Tancuime presentan los niveles mayores de 1-OHP ($2.0 \pm 4.55 \mu\text{mol 1-OHP/mol de Cr}$) y puede apreciarse que estos niveles disminuyen conforme incrementa la edad. En las comunidades de Santo Domingo y Laguna de San Vicente no se observa el mismo comportamiento. Al analizar los datos no se encontró diferencia entre los niveles de 1-OHP de acuerdo al sexo.

En este trabajo no se realizó ninguna determinación de algún biomarcador de daño. Sin embargo, para conocer la magnitud de la exposición en nuestros escenarios de

estudio, se realizó una comparación con niveles reportados en la literatura en los cuales puede presentarse un efecto en individuos expuestos a HAPs y nuestros resultados, en la Tabla 13 se muestran estos resultados.

En la Figura 13, se muestran los porcentajes obtenidos por los niveles de 1-OHP categorizados en relación a los índices de exposición biológica en escenarios ocupacionales (Guía Bechmarck). En donde se observa que el 42% de la comunidad de Tancuime se encuentra arriba del nivel de no efecto observado ($1.4 \mu\text{mol/mol}$ de Cr.).

CAPITULO VI

Discusión y Conclusiones

6.1 DISCUSIÓN

El método para cuantificar el 1-OHP por HPLC, fue desarrollado por primera vez en 1987 por Franz Joegenelen, a partir de entonces este método ha sido utilizado a nivel mundial para la evaluación de la exposición a HAPs, principalmente en escenarios ocupacionales (Angerer J y col., 1997; Omo M y col., 1998; Gündel J y col., 2000; Heudorf U. y Angerer J., 2001; Jacob J. y Seidel A., 2002).

En la actualidad en escenarios no ocupacionales (Viau C. y col., 2000; Fanou L.A., y col., 2005). Estudios realizados por otros investigadores han modificado algunas condiciones cromatográficas para obtener mejores resultados, estas modificaciones han sido desde la adición de ácido ascórbico a la fase móvil (Kuusimaki, 2004), hasta el uso de un sistema de columna de limpieza acoplada al cromatógrafo que sustituye el uso de las columnas de extracción (Ching-Tang K. y col., 2004). Estos estudios reportan diversos límites de detección y porcentajes de recobro en un rango muy amplio para 1-OHP. En la tabla 11, se comparan algunos parámetros obtenidos en el método de este estudio y parámetros reportados en la literatura. En base a los resultados obtenidos en la validación, consideramos que se lograron establecer las condiciones óptimas para la obtención de datos confiables. Se logró también probar la utilidad del método, al trabajar con diferentes niveles de exposición de 1-OHP de la población, lo que indica que el método es confiable para la identificación de diferentes escenarios de exposición.

En base a los resultados obtenidos de 1-OHP en orina de las poblaciones participantes en este estudio, la población infantil de Tancuime (Aquismón) se encuentra expuesta a altos niveles de pireno, por lo tanto se encuentra expuesta a altas concentraciones de HAPs. En esta comunidad indígena las viviendas son fabricadas con paredes de carrizos y techos de palma, tienen pisos de tierra, el clima es húmedo y presenta temperaturas mayores de 32° C en verano, las emisiones de los fogones de leña permanecen en el interior de la vivienda y en el techo se forman mezclas entre las grasas provenientes de los alimentos, la humedad del ambiente y

las partículas emitidas, contaminándose así, el interior de la vivienda, sus alimentos y las áreas de recreación interior de los niños pequeños. Estos factores en conjunto pueden estar asociados a los altos niveles de 1-OHP en esta población, consideramos que el uso de leña como fuente de energía es la principal fuente de exposición a HAPs.

Los niños menores de seis años de edad en esta comunidad presentaron la mayor concentración de 1-OHP lo que indica mayor tiempo de exposición con respecto a los niños mayores, esto lo atribuimos a su permanencia en el interior de la vivienda donde tienen un gran apego a sus madres.

Un estudio realizado en Burundi en población adulta expuesta al humo de leña reporta un valor promedio de 1-OHP de $1.50 \mu\text{mol/mol}$ de Cr (Viau, 2000), el valor de la mediana de 1-OHP en la población infantil de Tancuime fue de $2.17 \mu\text{mol/mol}$ de Cr, es decir aproximadamente el doble de la concentración en Burundi. Pese a que no son escenarios completamente iguales, la fuente de exposición es la misma y la concentración es mayor en la población infantil de Tancuime que en la población adulta de Burundi, lo que confirma los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud sobre la susceptibilidad y el riesgo en niños en estos escenarios rurales (WHO, 2002).

Para conocer la magnitud de la exposición en nuestros resultados en comparación con estudios realizados en población infantil, los resultados de 1-OHP de la comunidad de Tancuime reportados en ng de 1-OHP/g de Cr se compararon con un estudio realizado en población general (incluyendo población hispana) residente en Estados Unidos, esta investigación fue realizada por el Centro Nacional de Nutrición (NHANES por sus siglas) (CDC, 2003). Se seleccionaron solo los datos que se obtuvieron en niños de 6 a 11 años de edad (tabla 12), la población infantil de Tancuime tuvo aproximadamente 40 veces más de 1-OHP urinarios, que los niños evaluados en el estudio del NHANES.

Haciendo uso de los índices de exposición biológica (Jongeneelen, 2001) puede observarse en la Fig. 14 que, aproximadamente el 68% de la población infantil de Tancuime estuvo por arriba del límite de no efecto observado en trabajadores expuestos y con base a los efectos reportados en la literatura asociados con población ocupacionalmente expuesta (Tabla 13), puede observarse que la población infantil de Tancuime puede estar expuesta a HAPs puede presentar efectos a nivel genético (Intercambio de crómatides hermanas) y un 60% puede presentar efectos mutagénicos (incremento en la formación de aductos de ADN) que se encuentran por arriba del nivel de mínimo efecto observado en trabajadores expuestos. Estos datos no fueron confirmados en nuestro laboratorio, por lo que se propone continuar estudios en este sitio, para la evaluación del riesgo en salud por medio de biomarcadores de efecto que indiquen el grado de afectación en la población infantil de esta comunidad.

Escenarios con exposición a humo de leña, existen en toda la República Mexicana (Fig. 1), se estima que 3 millones 694 mil viviendas usan leña como fuente de energía, constituyendo cerca del 18% del total de la población nacional expuesta a esta fuente de HAPs, por lo que, es necesario evaluar la exposición en estos escenarios, ya que representan un problema de salud pública.

En estos escenarios los niños se encuentran expuestos a estos contaminantes desde su desarrollo en el vientre materno y posterior a su nacimiento continúan expuestos por el ambiente contaminado en su entorno, si aunado a esto se considera el nivel de desnutrición y pobreza existente en la mayoría de las comunidades rurales de nuestro país, esto podría ser un factor importante que disminuya su capacidad de madurez biológica y tenga una mayor susceptibilidad a presentar efectos adversos en la salud.

La comunidad de Laguna de San Vicente también se encuentra expuesta a pireno e HAPs, en esta comunidad además de las emisiones de las ladrilleras, existe también emisiones por el uso de leña. En esta comunidad no encontramos una diferencia estadística en los niveles de 1-OHP por el uso de leña. No todos los hogares de

estos niños usan leña para cocinar y en otros solo usan la leña una vez por semana, a diferencia de la frecuencia en el uso de este combustible en la comunidad de Tancuime, las estufas de leña en San Vicente no se encuentran en el interior de la vivienda sino en un área aparte. Al no encontrar diferencia en los niveles de 1-OHP por uso de leña, pero si encontrar niveles importantes de este metabolito con respecto a la población control, no expuesta al uso de leña y a las ladrilleras, consideramos que la fuente de exposición principal en esta comunidad son las emisiones de las ladrilleras. No encontramos diferencia en los niveles de los niños trabajadores (86%) con respecto a los no trabajadores (14%), aunque esto posiblemente sea atribuido al factor de respuesta (tamaño de muestra) en nuestra población. No encontramos diferencia en los niveles de 1-OHP por tipo de combustible utilizado en los hornos ladrilleros, esto posiblemente se deba a que el combustible no es homogéneo como en Tancuime (solo leña), sino que se usa una amplia variedad de materiales, y no siempre se quema el mismo tipo de material en el horno ladrillero.

Los niveles de 1-OHP comparados con el estudio NHANES mostraron que los niños de Laguna de San Vicente tuvieron niveles de 1-OHP aproximadamente 12 veces por arriba de los niños del NHANES (Tabla 12).

En la Fig. 14 puede observarse que Laguna de San Vicente la población infantil, se encuentra en los límites de exposición biológica de trabajadores no fumadores y trabajadores fumadores, aunque solo el 2.8 % de la población infantil de Laguna de San Vicente presentó niveles de 1-OHP (Tabla 13) mayores al nivel de no efecto observado, las concentraciones encontradas son importantes ya que la magnitud de la exposición en adultos puede ser mayor para los niños, es decir, que la exposición a concentraciones bajas de HAPs en población adulta (Fumadores) pueden ser concentraciones más tóxicas para la población infantil, por ello se recomienda continuar evaluando la exposición de la población a emisiones en comunidades ladrilleras de nuestro país.

En México existen varios estados con actividad ladrillera, en estos escenarios existen más de 300 ladrilleras en funcionamiento, las ladrilleras se encuentran dentro de las comunidades y en la periferia de las mismas. En esta micro industria familiar los niños participan y esto puede incrementar su riesgo de exposición. Es necesario evaluar la exposición a HAPs en estos escenarios ya que cada uno tiene sus propias características de exposición y mediante esta medida, podrá identificarse las comunidades ladrilleras de mayor riesgo.

Los niveles de 1-OHP cuantificados en la comunidad de Santo Domingo fueron más bajas que en las otras dos comunidades de estudio, a pesar de ello la población infantil presentó concentraciones de 1-OHP aproximadamente 4 veces mayores, que la población infantil del estudio NHANES (Tabla 12). La población seleccionada en esta comunidad no se encuentra expuesta la humo de leña ya que utilizan gas como combustible, no se encuentran expuestos de forma pasiva a humo de tabaco, por lo que consideramos que los niveles de 1-OHP encontrados en esta comunidad posiblemente muestren la exposición a HAPs por fuentes móviles. En base a los resultados obtenidos, la población de Santo Domingo se puede considerar como una población de baja exposición a HAPs no como una población control. Por lo que es recomendable continuar estudiando los escenarios rurales.

Este trabajo es el primer estudio de evaluación de la exposición a HAPs en población infantil y aporta, el uso de 1-OHP como biomarcador de exposición a pireno, asociado a la exposición al resto de los HAPs como herramienta de rápido análisis que contribuye a la identificación de las poblaciones de riesgo en nuestro país. Algunos de estas poblaciones pueden encontrarse en escenarios que no han sido evaluados y que es necesario evaluar, como zonas cercanas a industrias petroquímicas, microindustria ladrillera, quema en zonas agrícolas, minas de carbón, zonas con incendios forestales, zonas urbanas, entre otros.

6.2 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1).- Este trabajo, además de proporcionar información para la identificación de fuentes fijas generadoras de HAPs, cumplió con el propósito de identificar la población de mayor riesgo por exposición en población infantil en comunidades rurales del Estado de San Luís Potosí.

2).- Tancuime fue la comunidad con mayor probabilidad de presentar un riesgo en salud, por lo que se recomienda llevar a cabo una evaluación para comprobar verificar esta hipótesis. Esta comunidad forma parte de un gran numero de comunidades marginadas y con un importante índice de pobreza, lo que puede incrementar el riesgo en salud en estas comunidades.

3).- Es necesario continuar estudiando la exposición a HAPs en la comunidad ladrillera de Laguna de San Vicente, en este momento este sitio forma parte de un estudio que evalúa los efectos respiratorios en población infantil, expuesta a materiales de combustión en ladrilleras, por lo que se espera obtener mas información sobre la afectación en la población infantil de esta comunidad.

4) La evaluación de la exposición en la comunidad de Santo Domingo, nos proporciona información sobre la contaminación existente en comunidades rurales de nuestro país, por lo que se propone se evalué también la exposición de la población infantil, en las ciudades con mayores niveles de transito pesado y fuentes industriales.

5) Se recomienda necesario, mejorar la eficiencia del tiempo de análisis del método analítico para la determinación de 1-OHP y trabajar en el procedimiento de limpieza de la muestra, con el propósito de utilizar el método de extracción para el análisis de otros metabolitos urinarios de HAPs.

6) El aporte de este estudio es que proporciona una herramienta para la evaluación de la exposición a pireno, HAP que se encuentra presente en la mezcla de HAPs. La determinación de 1-OHP es una herramienta para la identificación de HAPs presentes en escenarios contaminados por mezclas de contaminantes (además de HAPs, CO₂, SO₂, NO₂, entre otros). Quizás sea complejo definir, en sitios donde existan varias fuentes de HAPs, específicamente cual fuente es la que contribuye con una concentración mayor de HAPs (ciudades donde existen fuentes móviles y fijas). Este trabajo contribuye con una herramienta nos ayuda a determinar si estos contaminantes cancerígenos están presentes o no en un escenario, que con el simple hecho de conocer la presencia de estos compuestos cancerígenos es ya un riesgo.

7) Este trabajo también es el inicio de la apertura de una línea de investigación que genere más información sobre los HAPs en diversos escenarios en México.

8) Además de esto el uso de 1-OHP se está aplicando como herramienta de evaluación del programa denominado “Programa de Intervención de Vivienda Indígena”, que se encuentra en proceso de desarrollo y que tiene como propósito disminuir la exposición no solo a la mezcla de HAPs sino a la mezcla de contaminantes (Monóxido de carbono, dioxinas) presentes en el aire interior de la vivienda (fogón tradicional con uso de leña). Los niveles de 1-OHP serán evaluados antes y después de la aplicación de piso firme y estufas ecológicas, en cada uno de los miembros de las familias que habitan estas viviendas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) IARC (2003) Internal Report No. 03/001: REPORT OF AN AD-HOC IARC MONOGRAPHS ADVISORY GROUP ON PRIORITIES FOR FUTURE EVALUATIONS. International Agency for Research on Cancer <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/internrep/2003-priorityreport.html>

- 1) ATSDR (2004), Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Creosote. U.S. Department of health & human services.

- 2) Angerer J, C. Mannschrek C, Gündel J. (1997) "Occupational exposure to PAHs in a graphite- electrode producing plant: biological monitoring of 1-OHP and monohydroxylated metabolites of phenanthrene" Int. Arch. Occup. Environ Health 69: 323-331

- 3) Marco dell'Omo, Giacomo Muzi, Giancarlo Marchionna, Luca Latini, Patrizia Carrieri, Piero Paolemili, Giuseppe Adbbritti (1998) "Preventive measures reduce exposure to PAHs at graphite electrode plant" Occup. Environ Med. vol.55:401-406.

- 4) Gündel J, Schaller K.H., Angerer J (2000) " Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of hydroxypyrene, 1-2-3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenz(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene. Int. Arch. Occup. Environ. Health 73:270-274

- 5) U. Heudorf, J. Angerer (2001) " Internal exposure to PAHs of children and adults living in homes with parquet flooring containing high levels of PAHs in the parquet glue" Int. Arch. Occup. Environ Health vol. 74: 91-101

- 6) Heudorf U and Arenger J. (2001) "Urinary nonhydroxylated phenanthrenes and hydroxypyrene – the effects of smoking habits and changes induced by smoking on monooxygenase – mediated metabolism". *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74:177-183
- 7) Jacob J and Seidel A. (2002) "Biomonitoring of PAHs in human urine" *Journal of Chromatography B*, 778: 31-47.
- 8) Gil L., Martínez V., Riquelme R., Ancic P., González G., Rodríguez L. y Adonis M. (2003). "Occupational and Environmental Levels of mutagenic PAHs and respirable particulate matter associated with diesel exhaust in Santiago, Chile" *Mutagenic PAHs and respirable particulate matter* 984-992.
- 9) Kuusimäki L., Peltonen Yrjö., Mutanen P., Peltonen K. and Savela K. (2004) "Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as marker of exposure to diesel exhaust" *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77:23-30.
- 10) Ruchiwarat M., Navasumrit P., Settachan D., Tuntaviroon J., Buthbumrung N and Sharma S. (2005) "Measurement of genotoxic air pollution exposures in street vendors and school children in and near Bangkok". *Toxicology and Applied Pharmacology*. 206: 207-214
- 11) Han Xianglu and Naeher P.L. (2005) "A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world" *Environment international*
- 12) Fiala Z., Vyskocil A., Krajak V., Viau C., Etterova E., Bukac J., Fialova D. and Emminger S (2001) " Environmental exposure of samall children to polycyclic aromatic hydrocarbons" *Int. Arch Occup Environ Health* 74: 411-420.
- 13) Viau C., Diahkité A., Ruzgyté A., Tuchweber B., Blais C., Bouchard M., Vyskocil A. (2002) "Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary

- polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions?. *Journal Chromtography B*, 778:165-177
- 14) Godoi A.F.L., Ravindra K., Godoi R.H.M., Andrade S.J., Santiago-Silva M., Vaeck L.V. and Grieken R.V. (2004) "Fast chromatographic determination of PAHs in aerosol samples from sugar cane burning" *Journal of Chromatography A*, 1027:49-53
- 15) Veenhuis R.T., van Horssen J., Bos R.P. Anzion R.B.M., van der Valk P.G.M. (2002) "Highly incresed urinary 1-hydroxypyrene excretion rate in patients with atopic dermatitis treated with topical coal tar" *Arch. Dermatol. Res.* 294:168-171.
- 16) Menzie A. Ch., Potocki B.B. and Santodonato J. (1992) "Exposure to carcinogenic PAHs in the envorinment" *Environ. Sci. Technol.* 86:7:1278-1284.
- 17) WHO/SDE/OEH/02.05 (2002) "The health effects of indoor air pollution exposure in developing countries". Geneve
- 18) WHO (2005) World Health Organization <http://www.who.int/en/>
- 19) Mc Donald J.D., Zielinska B., Fujita E.M., Sagebiel J.C., Chow J.C. and Watson J.G. (2000) "Fine particle and gaseous emission rates from residential wood combustion" *Environ. Sci. Technol.* 34:2080-2091.
- 20) Liu Y., Zhu Lizhong and Shen Xueyou (2001) "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, China" *Environ. Sci. Technol.* 35:840-844.
- 21) Myers I and Maynard R.L. (2005) "Polluted air outdoors and indoors" *Occupational Medicine* 55:432-438.

- 22) Khusshk W.A., Fatmi Z., White F and Kadir M.M. (2005) "Health and social impacts of improved stoves on rural women: a pilot intervention in Sindh, Pakistan" *Indoor Air* 15:311-316.
- 23) Luovsky K. (2002) *Environment Strategy. "Environment, Health and Poverty"* The world bank. <http://www.worldbank.org/index.html>
- 24) COFEPRIS (2002) Comisión Federal para la protección contra riesgos sanitarios, Dirección General de Salud Ambiental. "Primer Diagnóstico Nacional de Salud Ambiental y Ocupacional" 105 págs.
www.cofepris.gob.mx/bv/libros/l31.pdf
- 25) Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. "Padrón de Ladrilleras 2005 en Ciudad Juárez, Chihuahua. Instituto de Ciencia Biomédicas Básicas. Dra. Corral A.
- 26) Jongeneelen F.J. (1996) "Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: 1-hidroxypyrene in urine" *InduxTox* . WHO-Geneve Cap.2 vol. 2
- 27) Yongjian Liu, Lizhong Zhu, and Xueyou Shen (2001) "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor and Outdoor air of Hanzhoug, China". *Environ. Sci. Technol.* 35:5:840-844.
- 28) Jongeneelen F.J. (1996) Chapter 4.2 Biological monitoring of PAHs: 1-hidroxypyrene in urine. "Biological monitoring of chemical exposure in the workplace" Vol. 2 WHO-Geneve, ISBN:951-802-167-8. *Indus Tox*.
- 29) Jongeneelen F.J. (1997) "Methods for rutine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *The Science of total environment* 199: 141-149
- 30) Jongeneelen F.J. (1987) " Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine" *Journal of Chromatography* 413:227-232

- 31) Waidyanatha S., Zheng Y., Serdar B and Rappaport S.M. (2004) "Albumin adducts of Naphthalene metabolites as biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons" *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 13:117-124.
- 32) Bouchard M. and Viau Claude (1999). "Urinary 1-hidroxypyrene as a biomarker of exposure to PAHs: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments". *Biomarkers* 4:3:159-187.
- 33) Strickland P., Kang D. and Sithisarankul P. (1996) "PAHs metabolites in urine as biomarkers exposure and effect". *Environmental Health Perspectives* 104:5:927-932.
- 34) C. Viau, A. Vysocil, L. Martel (1995) "Background urinary 1-hydroxypyrene levels in non-occupationally exposed individuals in the Province of Québec, Canadá and comparison with its excretion in workers exposed to PAH mixtures" *The Science of the Environment* 163:191-194.
- 35) Joop H. van Wijnen, Rita Slob, Gonnje Jongmans-Liedekerken, Rick H.J. van Weerdt and Fred Woudenberg (1996) "Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among dutch children" *Enviromental Health Perspective* 104: 530-534
- 36) Chuang J., Callahan P., Lyu C. and Wilson N. (1999) "Polycyclic aromatic hydrocarbons exposures of children in low-income families". *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 2:85-98.
- 37) Wang Y., Zhang W., Dong Y., Fan R., Sheng G and Jiamo Fu. (2005) "Quqntification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic

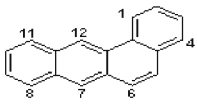
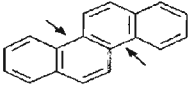
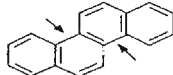
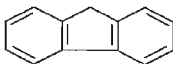
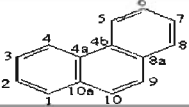
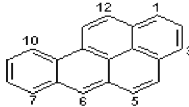
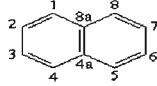

- hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection” *Anal. Bioanal. Chem.* 383:804-809.
- 38) Jongeneelen F.J. (2001) “Benchmark Guideline for Urinary 1-hidroxypyrene as Biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons” *Ann. Occup. Hyg* 45:1:3-13.
- 39) Van Grevenynghe J, Bernard M, Langouet S, Berre L.C, Fest T and Fardel O (2005) “Human CD34-Positive Hematopoietic Stem Cells constitute targets for carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons” *314:2:693-702.*
- 40) Bocksay K., Tang D., Orjuela M.A., Liu Xinhua., Warburton D.P. and Perera P F. (2005) “Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2:506-511.
- 41) Vineis P. and Husgafvel-Pursiainen K. (2005) “Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations” *Carcinogenesis* 26:11:1846-1855.
- 42) Srám R.J., Binková B., Dejmek j. and Bobak M. (2005) “ Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature” *Environmental Health Perspectives* 113:4:375-382.
- 43) Kamiya M., Toriba A., Onoda Y., Kizu R and Hayakama K. (2005) “Evaluation of estrogenic activities of hidroxylyated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate”. *Food and Chemical Toxicology* 43:1017-1027.
- 44) Perera F.P, Rauh V, Whyatt R.M., Tang D., Tsai W.Y., Bernert J.T., Tu Y.H., Andrews H., Barr D.B., Camann D.E., Díaz D., Dietrich J., Reyes A., Kinney P.L. (2005) “ A summary of recent findings on birth outcomes and developmental

- effects of prenatal ETS, PAH, and Pesticide Exposure” *Neurotoxicology* 26:573-587.
- 45) Boffeta P, Jourenkova and Gustavsson P. (1997) “Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons”. *Cancer Causes and Control* 8:444-472
- 46) Ronneberg A., Haldorsen T., Romundstad P and Andersen A. (1999) “Occupational exposure and cancer incidence among workers from an aluminum smelter in western Norway” *Scand J Work Environ Health* 25:3:207-214.
- 47) Cross A.J and Sinha R. (2004) “Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44:44-55.
- 48) Rehwagen M., Muller A., Massolo L., Herbarth O. and Ronco A. (2005) “Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas”. *Science of the Total Environment* 348:199-210.
- 49) USEPA (2005) U.S Environmental Protection Agency. Particulate matter research publications. <http://search.epa.gov>
- 50) Jedrychowski W, Galas A, Pac A, Flak E., Camman D, Rauh and Perera F. (2005) “Prenatal ambient air exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the occurrence of respiratory symptoms over the first year of life”. 20:775-782.
- 51) Nigel B., Pérez-Padilla R. and Albalak R. (2000) “Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge”. *Environment and Health. Bulletin of the World Health Organization* 78:9.

- 52) Saha A, Rao Mohan N, Kulkarni P.K. Kulkarni P.K., Majundar P.K. and Saiyed H.N (2005) “ Pulmonary function and fuel use:A population survey. *Research Respiratory* 6:127-132.
- 53) Dibley M.J. Goldsby J.B., Staehling N.W., Trowbridge F.L. (1987) Development of normalized curves for the international growth reference: historical and technical considerations, *Am J Clin Nutr* Vol 46:736-48.
- 54) Strickland P. and Kang D. (1999) “Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter” *Toxicology letters* 108: 191-1999.
- 55) Boy E., Bruce N. and Delagado H. (2002) “Birth weight and exposure to kitchen wood smoke during pregnancy in rural Guatemala” *Environmental Health Perspectives* 110:1:109-114.
- 56) Strunk P., Ortlepp K., Heinz H., Rossbach B. and Angerer J (2001) “ Ambient and biological monitoring of coke plant workers- determination of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons” *International Archives of Occupational and Environmental Health*.
- 57) Viau C, Hakizimana G. and Bouchard M (2000) “Indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon monoxide in traditional houses in Burundi”. *Int. Arch Occup Environ Health* 73: 331-338.
- 58) CONAPO (2000). “Cuadro resumen, población total, indicadores socioeconómicos, índice y grado de marginación por localidades de la entidad federativa”. Consejo Nacional de Población

- 59) CDC (Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos) (2003) "Segundo informe nacional sobre la exposición humana a compuestos químicos ambientales" Departamento de Salud y Servicios Humanos.
- 60) Urbietta M.T, Eguiarte I y Montes J. (2000) "Documentación: Determinación de 1-hidroxipireno en orina- Método de hidrólisis enzimática con detección fluorométrica/cromatografía líquida de alta resolución" Ministerio de trabajo y asuntos sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- 61) Ching-Tang K., Hong-Wen Ch. and Jiann-Lin Ch. (2004) "Determination of 1-OHP in children urine using column-switching liquid chromatography and fluorescence detection" *Journal of chromatography B*, 805:187-193.
- 62) Eurachem Guide (1998). Europa Analytical Chemistry. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. A focus for analytical chemistry in Europe.
- 63) Sánchez R. G. (1994) Evaluación de Riesgo a la Salud por Exposición a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en la Población de Coatzacoalcos, Veracruz. Tesis de Maestría Instituto Nacional en Salud Pública. Cuernavaca, Mor. México.
- 64) Zapata-Pérez O, Castañeda G., Ceja V., Gold-Bouchot G y Leticia C and Albores Arnulfo (2004). Toxicokinetics of Pyrene in Tilapias *Oreochromis niloticus* Following Intraperitoneal Administration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72: 1253-1259.

Tabla 1. HAPs y sus metabolitos urinarios en humanos.

| Estructura Química | HAP | Metabolito hidroxilado |
|---|--------------------|--|
|  | Benzo(a)antraceno* | 1-Hidroxibenzo[a]antraceno 3-Hidroxibenzo[a]antraceno |
| | Benzofenantreno | 1-Hidroxibenzo[c]fenantreno 2-Hidroxibenzo[c]fenantreno |
|  | Criseno* | 3-Hidroxicriseno 6-Hidroxicriseno |
|  | Fluoranteno* | 1-Hidroxifluoranteno |
|  | Fluoreno | 2-Hidroxifluoreno 3-Hidroxifluoreno |
|  | Fenantreno | 1-Hidroxifenantreno 2-Hidroxifenantreno |
|  | Benzo(a)pireno* | 3-Hidroxibenzo(a)pireno |
|  | Naftaleno | 1- Hidroxinaftaleno 2- Hidroxinaftaleno |
|  | Pireno | 1-Hidroxipireno |

(NHANES, 2003)

Tabla 9. Datos sociodemográficos de las comunidades de estudio.

| | Santo Domingo (n=17) | Laguna de Sn. Vicente (n=35) | Tamcuime (n=19) |
|--|-------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Sexo | | | |
| Niñas | (9) 52% | (17) 47% | (10) 52% |
| Niños | (8) 47% | (19) 52% | (9) 47% |
| Edad (años) ± d.e (mínimo-máximo) | | | |
| | 8.6 ± 1.4 (7-11) | 9.1 ± 1.6 (7-13) | 9.7 ± 4.1 (3-19) |
| Tiempo de residencia | | | |
| | 8.9 ± 1.6 | 9.6 ± 4.0 | 8.27 ± 2.19 |
| NSE* | | | |
| D+ (bajo/alto) | (12) 80% | (26) 72% | (0) |
| D (bajo) | (2) 13% | (7) 19% | (0) |
| E (ingreso mínimo) | (1) 6% | (3) 8% | (19) 100% |
| Tabaquismo pasivo | | | |
| Si | (4) 27% | (15) 43% | (7) 36% |
| No | (11) 73% | (20) 57% | (12) 63% |
| Uso de leña | | | |
| Si | 0% | (21) 62% | (19) 100% |
| No | (15) 100% | (13) 38% | (0) |
| Niños que trabajan en la ladrillera | | | |
| Si | ----- | (30) 86% | ----- |
| No | | (5) 14% | |
| Trabajo niño | | | |
| (horas/día) (mínimo- máximo) | ----- | 2 (0-4) | ----- |

*Nivel socioeconómico cuestionario AMAI

Tabla 10. Mediciones antropométricas en los niños residentes de las comunidades de estudio

| | | Santo Domingo | Laguna de San Vicente | Tancuime |
|----------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------|----------|
| Z Peso/edad D. Aguda | Desnutrición % <2DE* | 0 | 14.8 | 9.0 |
| | Normal | | | |
| Z Talla/edad D. Crónica | Desnutrición % < 2DE* | 12.5 | 3.7 | 18.1 |
| | Normal | | | |
| Z Peso/Talla | Sobrepeso %> 2DE* | 6.2 | 25.0 | 0 |

*Valores utilizados en la Encuesta Nacional de Nutrición (1999)

Tabla 11. Comparación de los parámetros de validación

| | Recuperación de 1-OHP (%) | LDD (nmol/L) | LC (nmol/L) | Rango lineal (nmol/L) y (r) | %CV (nmol/L) |
|---|---------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|-----------------|
| Jongeneelen 1987 (1-OHP) | 83-88 ± 9 | 0.5 | NR* | (10-800) 0.99 | 12.6 (167) |
| Nuestro método 2006 (1-OHP) | 101-105% | 0.1 | .36 | (7.2 – 60) 0.99 | 7 (1.5) |
| Kuusimäki 2004 (para varios metabolitos) | 84 ± 17 | 0.1 - 0.4 | 6.9 | NR* | 5-13 (23) |

*no reportado

r= coeficiente de correlación

LDD= Límite de detección

LC= Límite de cuantificación

CV=coeficiente de variación

Tabla 12. Niveles de 1-OHP en población infantil por percentiles.

| Edad (años) | Zona | Media ng/g de creat | 10 | 25 | 50 | 75 | 90 | 95 | n |
|-------------|-----------------------|---------------------|------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----|
| 6-11 | NHANES (1999-2000) | 94.1 (76-115) | 31.6 (13-46) | 56.5 (45-65) | 91.2 (82.1-107) | 168 (124-237) | 333 (231-486) | 474 (332-849) | 310 |
| 6-11 | 1 | 398 (237-559) | 31 (6-56) | 371 (272-469) | 494 (479-508) | 663 (510-816) | 1069 | ----- | 15 |
| 6-11 | 2 | 1142 (806-1477) | 160 (-80-401) | 441 (361-521) | 656 (595-717) | 1187 (960-1414) | 1894 (1553-2235) | 3444 (1492-5395) | 33 |
| 6-11 | 3 | 3798 (2248-5348) | ----- | 1495 (37-2952) | 2980 (1926-4035) | 4866 (2912-6820) | 7655 | ----- | 9 |

Zona 1=Santo Domingo (control)

Zona 2=Laguna de San Vicente (Ladrilleros)

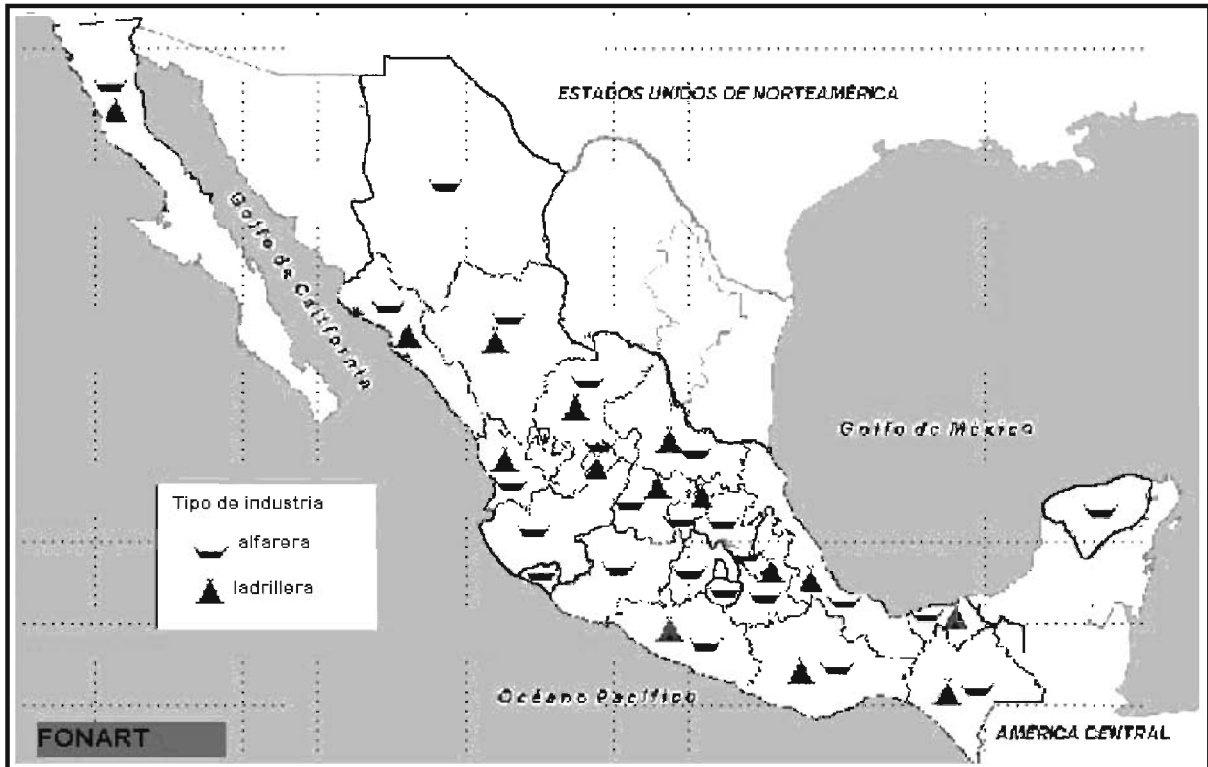
Zona 3= Tancuime (uso de leña)

NHANES = Instituto Nacional de Nutrición de los Estados Unidos

Tabla 13. Índices de Exposición Biológica reportados en la literatura y efectos asociados.

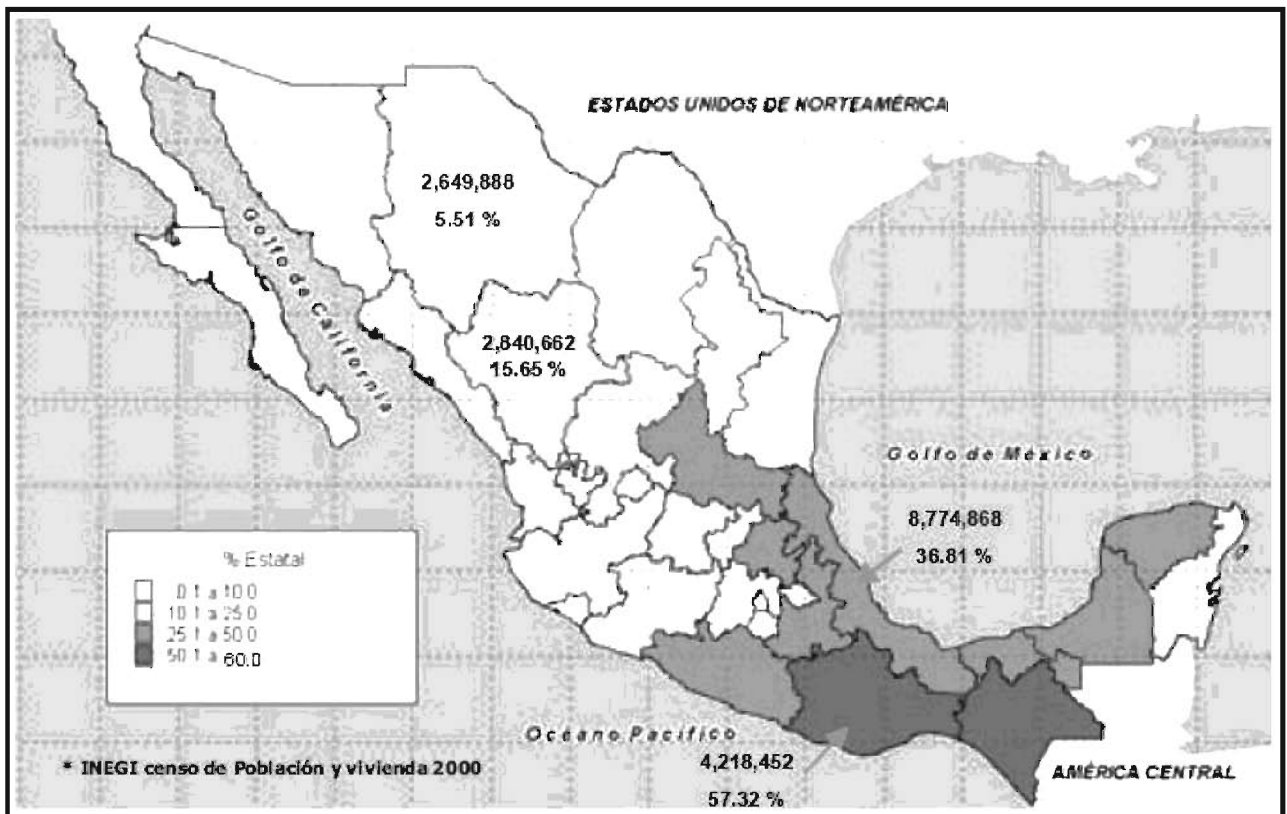
| 1-OHP mmol/mol de creatinina | EFFECTOS | Sto. Domingo % | Laguna de San Vicente % | Tancuime % |
|------------------------------|------------------------------------|----------------|-------------------------|------------|
| > 1.4 | Intercambio de cromátides hermanas | 0 | 2.8 | 68 |
| > 1.9 | Aductos de DNA en linfocitos | 0 | 2.8 | 60 |

Figura 1. Distribución de hornos ladrilleros y alfareros en la República Mexicana.



COFEPRIS, 2002

Figura 2. Población expuesta al uso de leña y carbón en la República Mexicana



COFEPRIS, 2002

Figura 3. Esquemas del metabolismo y mecanismo de toxicidad de HAPs.

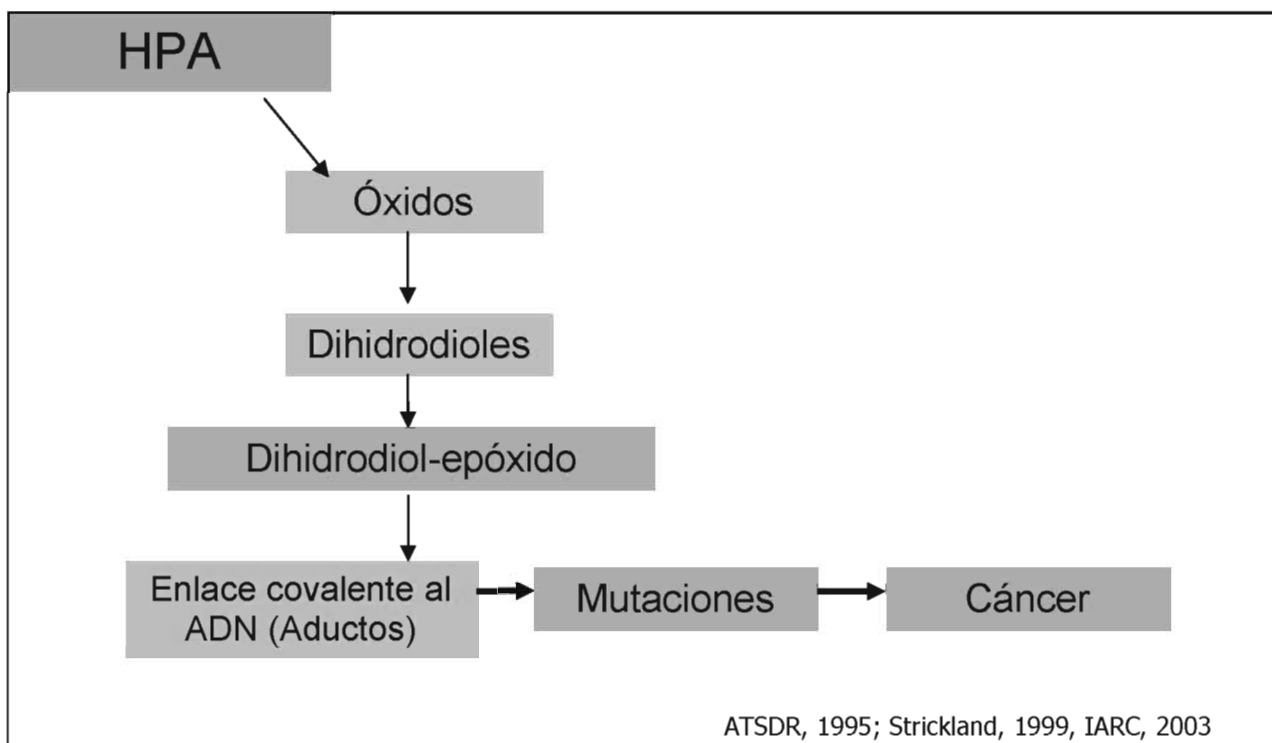
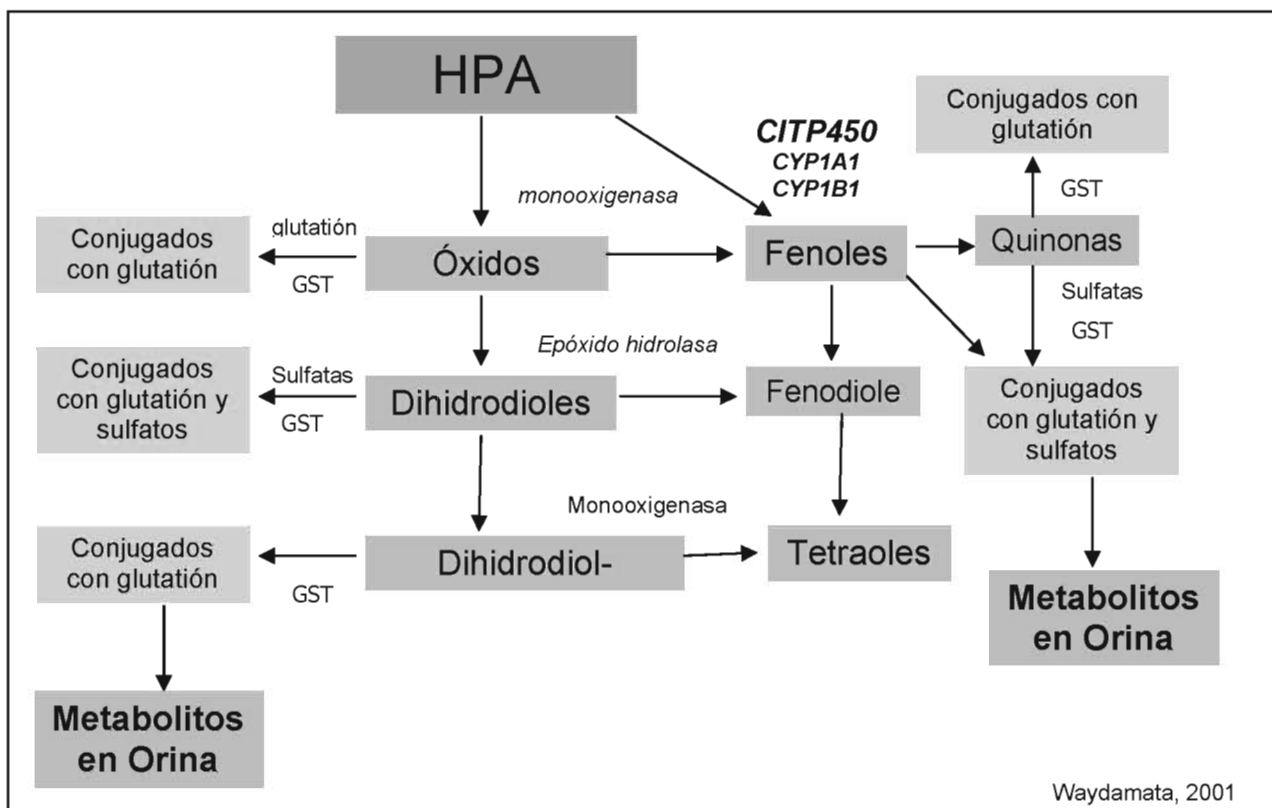


Figura 4. Localización de las zonas de estudio en el estado de San Luis Potosí.



Figura 5. Cromatograma curva estándar de 1-OHP en metanol.

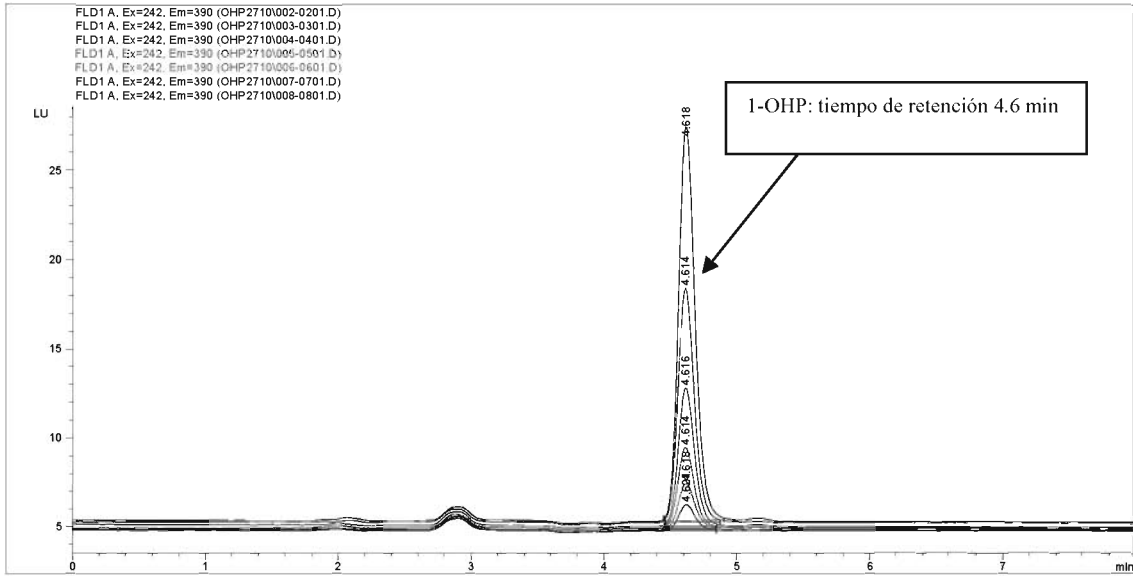


Figura 6. Cromatograma curva estándar 1-OHP en orina.

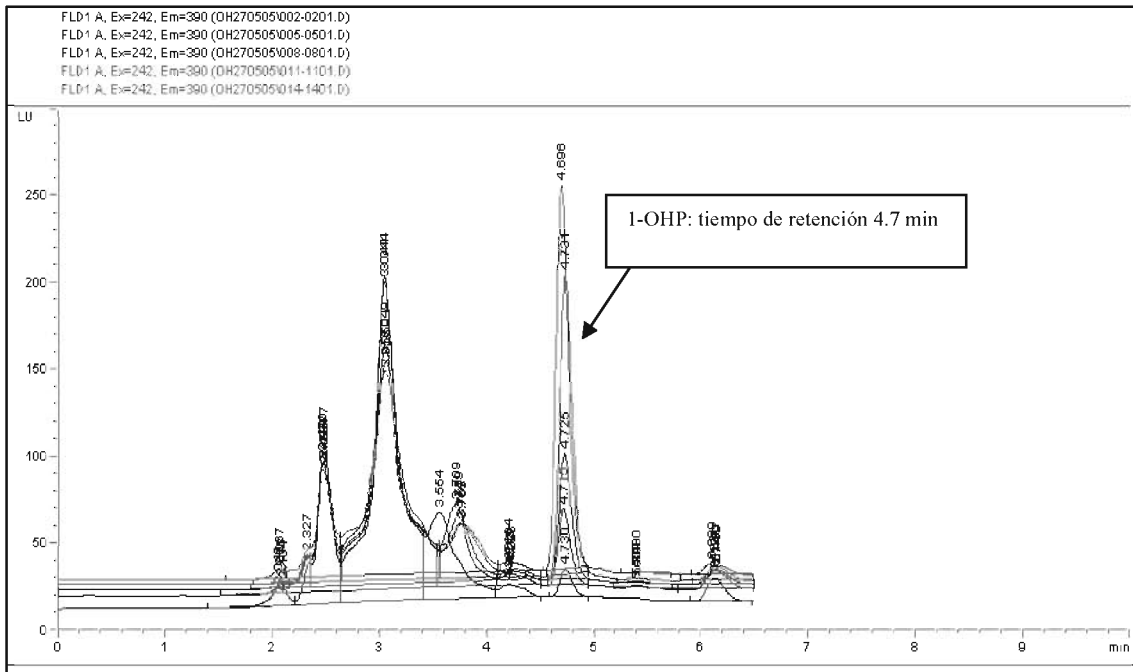


Figura 7. Comparación del comportamiento de las pendientes de 1-OHP

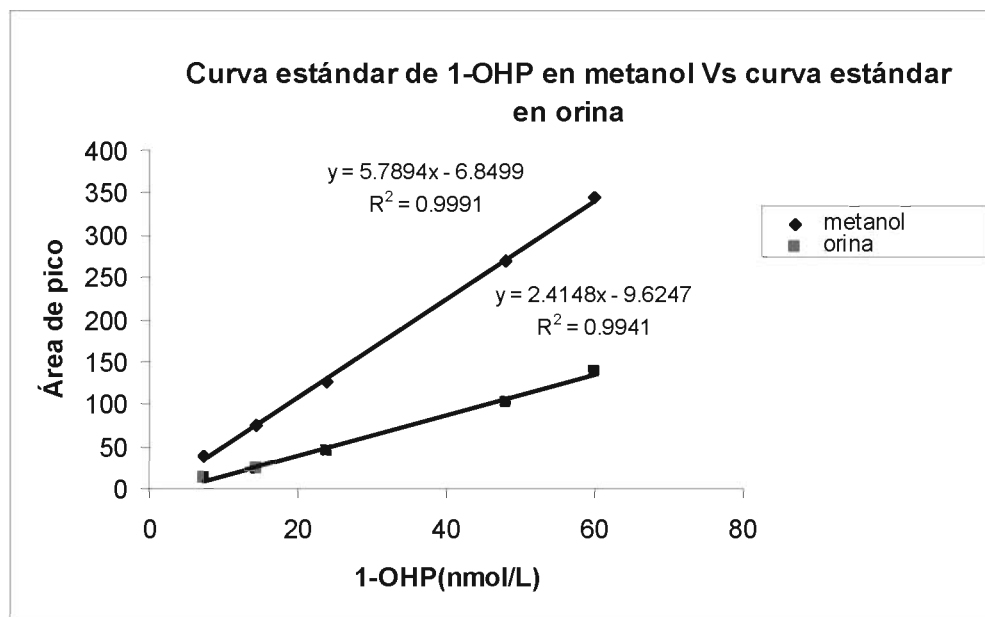
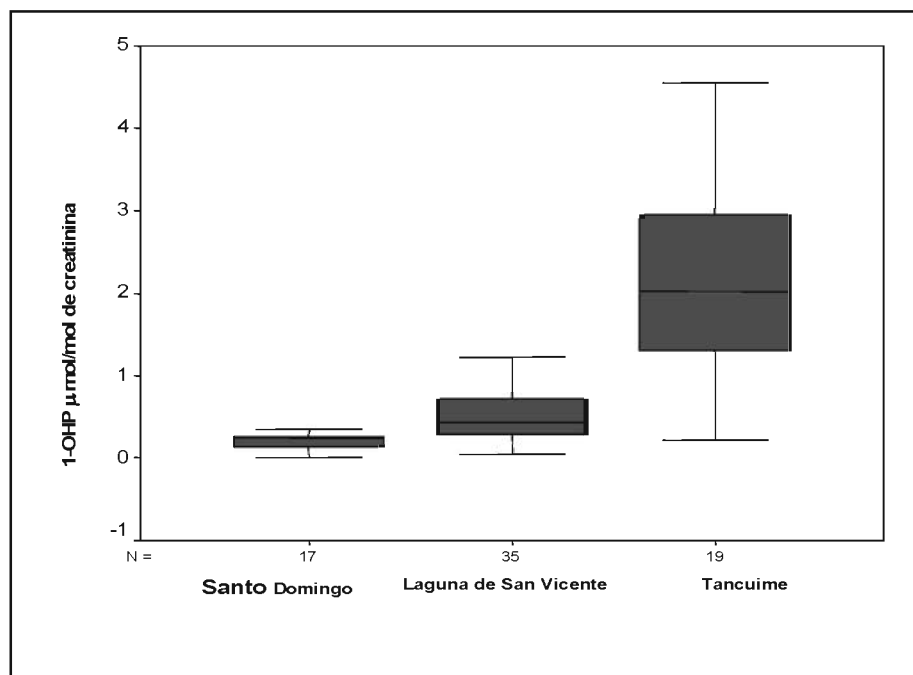
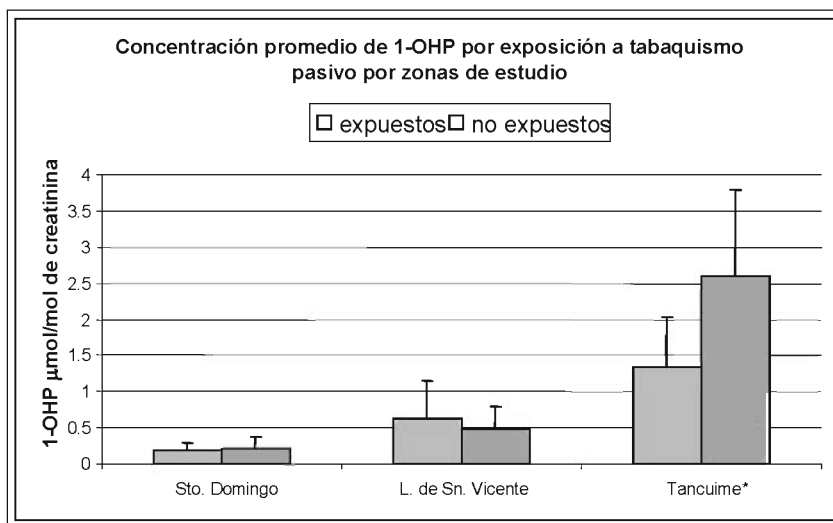


Fig. 8 Comparación de la concentración de 1-OHP por zonas de estudio



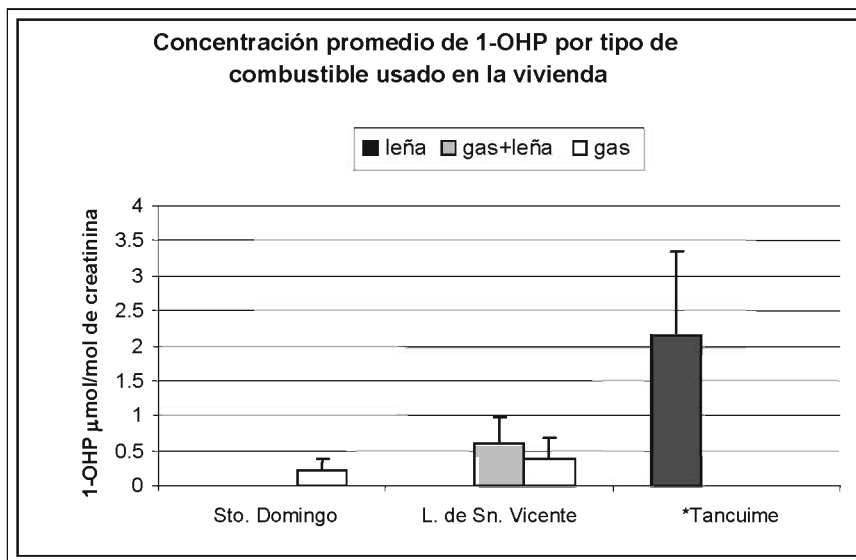
* Kruskal Wallis $p < 0.01$

Fig. 9 Concentración de 1-OHP por comunidad de estudio según tabaquismo pasivo.



Kruskal Wallis * $p < 0.05$

Fig. 10 Concentración de 1-OHP por comunidades de estudio según tipo de combustible.



Kruskal Wallis * $p < 0.05$

Fig. 11 Concentración de 1-OHP por tipo de combustible utilizado en los hornos ladrilleros.

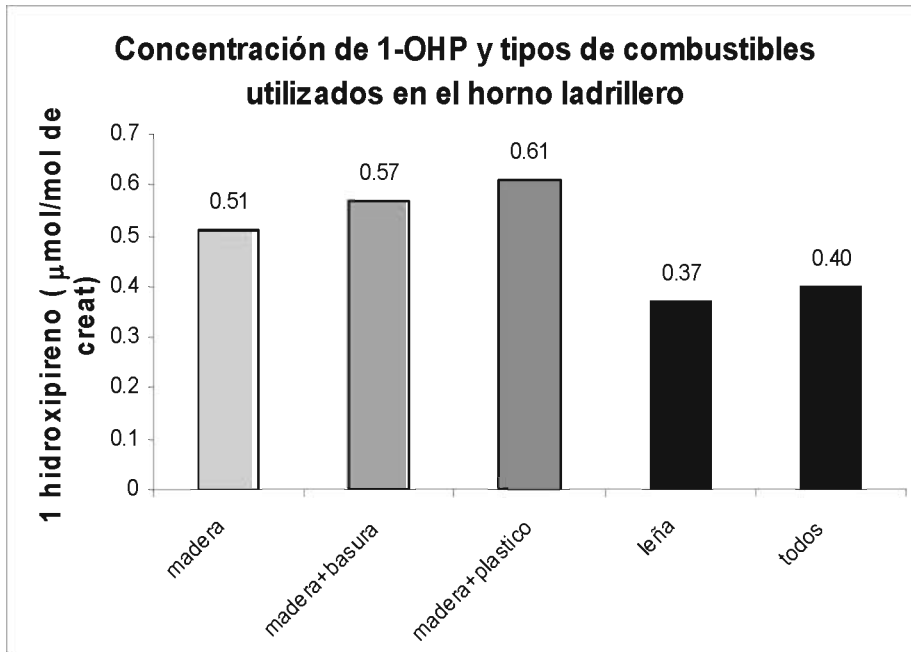


Fig. 12 Concentración de 1-OHP por comunidad de estudio según rango de edad.

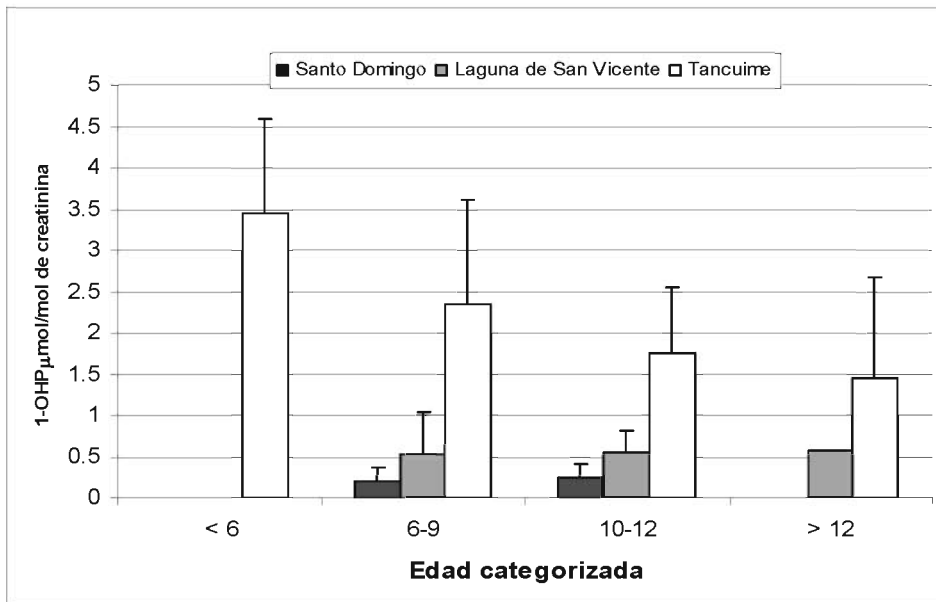
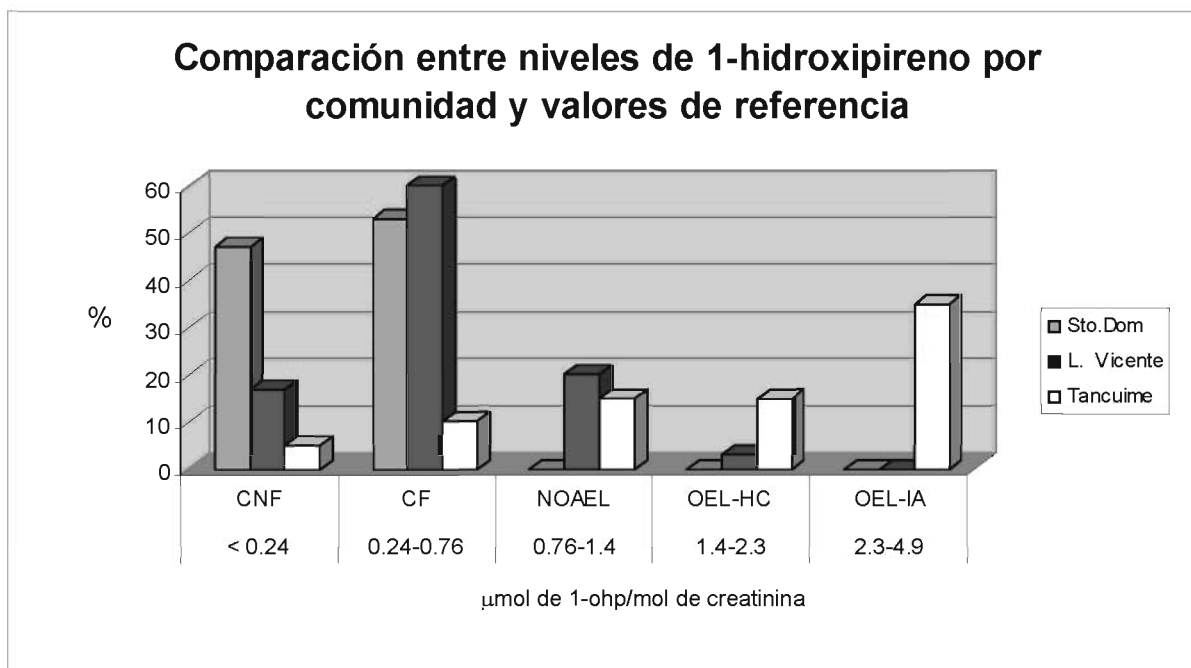


Figura 13. Porcentaje de la población infantil por comunidad de estudio según índices biológicos de exposición.



0.24 μmol 1OHP/mol de Cr = Controles No fumadores, no expuestos

0.76 μmol 1OHP/mol de Cr = Controles Fumadores, no expuestos

1.4 μmol 1OHP/mol de Cr = Nivel de no efecto en trabajadores expuestos

2.3 μmol 1OHP/mol de Cr = Límite de exposición ocupacional en hornos de coque

4.9 μmol 1OHP/mol de Cr = Límite de exposición ocupacional industria de aluminio

ANEXO 1

Reactivos y preparación de soluciones.

Reactivos: Metanol y Acetonitrilo (Burdick & Jackson, grado HPLC), ácido acético glaciado 100% (MERCK), agua desionizada (MiliQ > 18 Ω M), columnas de extracción fase reversa Octadecil C18 polar plus (J.T. Backer), estándar de referencia para 1-OHP 98% (ALDRICH), enzima β -glucuronidasa/arilsulfatasa de Helix Pomatia tipo H-2 (98000 U)(SIGMA), congelador -86° C (REVCO Technologies), balanza analítica (explorer OHAUS), evaporador (Zymark), estándares certificados para 1-OHP Clin Cal-Recipe (calibrador 1 y 2 liofilizados/ Munich/Germany) No. 50013 (9.1 nmol/L) y No. 50014 (32.5 nmol/L).

1) SOLUCION AMORTIGUADORA DE ACETATO/AC. ACETICO 0.2 M pH=5.0

Pesar 0.75g de Acido ascórbico

Pesar 27.216 g de Acetato de sodio

Agregar el ácido ascórbico y el acetato de sodio a 900 ml de agua desionizada, mezclar con agitación magnética, ajustar pH=5.0 con ácido acético glaciado, aforar en matraz volumétrico de 1L.

2) SOLUCION DE ACIDO ASCÓRBICO EN METANOL 1mg/mL

Pesar 0.01g de ácido ascórbico, disolver, mezclar en vortex y aforar con metanol en matraz volumétrico de 10ml.

3) SOLUCION ESTANDAR 4.8 mM DE 1-HIDROXIPIRENO

Pesar 0.01047g de estándar de referencia de 1-OHP, en un matraz volumétrico de 10 ml colocar 100 μ l de ácido ascórbico (1mg/ml) agregar 5 ml de metanol, agregar la cantidad previamente pesada de 1OHP disolver, aforar con metanol y resguardar en recipiente ámbar silanizado en congelador a -20° C.

4) SOLUCION ESTANDAR 24 μ M DE 1-HIDROXIPIRENO (Preparar cada 2 meses)

En un matraz volumétrico de 10 ml colocar 100 μ l de ácido ascórbico (1mg/ml), agregar un volumen de 50 μ l de solución stock de 4.8 mM mezclar en vortex 1 min. y aforar con metanol, resguardar en recipiente ámbar silanizado a -20° C.

5) SOLUCION ESTANDAR 240 nM DE 1-HIDROXIPIRENO (para curva estándar en orina)

Tomar 50 μ l de Ac. Ascórbico 1mg/ml y colocar en matraz volumétrico de 5 ml, añadir 50 μ l de solución stock de 24 μ M, mezclar en vortex 1 min. Aforar con metanol.

6) SOLUCIÓN AMORTIGUADORA/AGUA 1:1 mas 2% METANOL (SAAM)

Colocar 10.4 ml de metanol en probeta de 500 ml aforar con agua desionizada hasta 260 ml, vaciar en un recipiente ámbar de 1L y agregar 260ml de solución amortiguadora de acetatos. Almacenar en el refrigerador hasta su uso.

7) ACETONITRILO 30%

Colocar 120 ml de ACN en probeta de 500 ml, agregar agua desionizada hasta la marca de 400 ml. Almacenar en el refrigerador hasta su uso.

8) METANOL 30%

Colocar 120 ml de Metanol en probeta de 500ml, agregar agua desionizada hasta la marca de 400ml. Almacenar en el refrigerador hasta su uso.

9) METANOL 1% AC. ACÉTICO

Colocar 3ml de ácido acético glacial en probeta de 500 ml, agregar metanol hasta la marca de 300ml.

ANEXO 2

Evaluación del estado nutricional

Los niños participantes del estudio fueron pesados y medidos durante la realización del muestreo. Se calculó la talla y peso para la edad como indicadores de desnutrición (crónica o aguda).

Talla para la edad = Estatura actual o talla (cm)/referencia de estatura para la edad(cm) *100

Peso para la edad=Peso actual (kg)/referencia de peso para la edad (kg)*100

Peso para la talla = Peso actual (kg)/referencia de peso para la talla (Kg)* 100

Los índices de referencia de talla y peso para la edad, fue el percentil 50 de las tablas del Centro Nacional de Estadística de Salud de los Estados Unidos (NCHS).

ANEXO 3

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
TOXICOLOGÍA AMBIENTAL, FACULTAD DE MEDICINA

EXPOSICIÓN A HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN LA COMUNIDAD DE
LAGUNA DE SAN VICENTE, VILLA DE REYES-S.L.P.
Escuela primaria

FOLIO | | | |

Fecha de entrevista _____

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN

1.1 Nombre del padre _____

1.2 Nombre de la madre _____

1.3 Nombre del niño _____

1.4 Domicilio particular _____

1.5 Entre que calles _____

1.6 Teléfono _____

1.7 Edad del niño _____

1.8 Grado escolar y grupo _____

1.9 Lugar de nacimiento _____

1.10 Fecha de nacimiento _____

1.11 Cuantos hermanos tiene el niño _____

II. EXPLORACION FISICA

2.1 Peso Kg _____

2.2 Talla cm _____

2.3 IMC _____

2.4 Aseo general

Bueno.....01
Regular.....02

Malo.....03

III. HISTORIA MEDICA**3.1 antecedentes personales patológicos (señale mas de una si es necesario)**

- Problemas respiratorios al nacimiento
 Infecciones en los ojos
 Infecciones en los oídos
 Infecciones frecuentes en la garganta
 Flema
 Tos
 Silbidos en el pecho
 Irritación ocular
 Diarreas
 Irritación o problemas de la piel
 Ninguno
 Otros ¿Cuáles? _____

3.2 ¿Actualmente el niño tiene alguna enfermedad?

Si.....01

No.....02

¿Cuál? _____

3.3 ¿Actualmente el niño toma algún medicamento?

Si.....01

No.....02

¿Cuál? _____

Dosis _____

3.4 ¿Algún o algunos hermano (s) del niño han fallecido?

Si.....01

No.....02

¿De qué? _____

3.5 ¿Alguno o algunos de los hermanos del niño están enfermos?

Si.....01

No.....02

¿De qué? _____

3.6 ¿Algún miembro de la familia fuma?

Si.....01

No.....02

¿Quién? _____

3.7 ¿Quema la basura que recolecta de su casa?

Si.....01

No.....02

¿En dónde? _____

3.8 ¿Cuántas veces come su niño al día? (desayuno, comida, cena)

Una.....01
Dos.....02
Tres.....03

3.9 ¿Qué es lo que desayuna su niño normalmente? (Hoy)

3.10 ¿ En su familia acostumbran a comer alimentos asados?

Si.....01
No.....02

3.11 ¿Cuándo fue la última vez que su hijo comió jamón, salchicha o carne asada?

IV. ACTIVIDAD LADRILLERA

4.1 ¿ Tiene ladrillera en el patio de su casa? (distancia)

Si.....01
No.....02

4.2 ¿Existen ladrilleras cerca de su casa? (Cuántas)

Si.....01
No.....02

4.3 ¿Qué clase de combustible utiliza para quemar en el horno ladrillero?

Leña.....01
Aceite quemado.....02
Diesel.....03
Madera.....04
Fibras.....05
Plásticos.....06
Otros _____

4.4 ¿Cuántas horas y que días trabaja el niño en la ladrillera?

4.5 ¿Qué actividad realiza el niño en la ladrillera?

V. NIVEL SOCIOECONÓMICO

5.1 ¿Cuál es la ocupación del padre?

Profesional.....01
 Empleado de mando medio..... 02
 Obrero estable.....03
 Jubilado.....04
 Desempleado..... 05
 Otros..... 06

¿Cuál?

5.2 ¿Cuál es la ocupación de la madre?

Hogar.....01
 Otro _____

5.3 Pensando en el Jefe de familia de su hogar ¿cuál fue el ultimo año de estudios que completo? (espere respuesta y pregunte) ¿Realizo otros estudios? (reclasificar si es necesario).

- 1. No estudio
- 2. Primaria incompleta
- 3. Primaria completa
- 4. Secundaria incompleta
- 5. Secundaria completa
- 6. Carrera comercial
- 7. Carrera técnica
- 8. Preparatoria incompleta
- 9. Preparatoria completa
- 10. Licenciatura incompleta
- 11. Licenciatura completa
- 12. Diplomado o Maestría
- 13. Doctorado
- 14. NS/NC

Grado _____

5.4 Pensando en la madre ¿cuál fue el ultimo año de estudios que completo? (espere respuesta y pregunte) ¿Realizo otros estudios? (reclasificar si es necesario).

- 1. No estudio
- 2. Primaria incompleta
- 3. Primaria completa
- 4. Secundaria incompleta
- 5. Secundaria completa
- 6. Carrera comercial
- 7. Carrera técnica
- 8. Preparatoria incompleta

- 9. Preparatoria completa
- 10. Licenciatura incompleta
- 11. Licenciatura completa
- 12. Diplomado o Maestría
- 13. Doctorado
- 14. NS/NC

Grado _____

5.5 ¿Cuál es el total de las piezas y/o habitaciones con que cuenta su hogar?, por favor no incluya baños, medios baños, pasillos, patios, y azoteas.

- 1. Uno
- 2. Dos
- 3. Tres
- 4. Cuatro
- 5. Cinco
- 6. Seis
- 7. Siete o más

5.6 ¿Cuántos baños completos con regadera y W.C. (excusado) hay para uso exclusivo de los integrantes de su hogar?

- 0. Cero
- 1. Uno
- 2. Dos
- 3. Tres
- 4. Cuatro o más

5.7 En su hogar ¿cuenta con calentador de agua o boiler?

- 0. No
- 1. Sí

5.8 Contando todos los focos que utiliza para iluminar su hogar, incluyendo los de los techos, paredes y lámparas de buró o piso, dígame ¿ cuántos focos tiene en su vivienda?

- 1. Cinco o menos
- 2. Entre seis y diez
- 3. Entre once y quince
- 4. Entre dieciséis y veinte
- 5. Veintiuno o más

5.9 ¿ El piso de su hogar es predominantemente de tierra, o de cemento, o de algún otro tipo de acabado?

- 1. Tierra
- 2. Cemento (firme de)
- 3. Otro tipo de material o acabado

5.10 ¿Cuántos automóviles propios, excluyendo taxis, tiene su hogar?

- 0. Ninguno

- 1. Uno
- 2. Dos
- 3. Tres

5.11 Cuenta su hogar con aspiradora que funcione?

- 0. No
- 1. Sí

5.12 ¿Cuenta su hogar con lavadora de ropa que lave y enjuague automáticamente que funcione?

- 0. No
- 1. Sí

5.13 ¿Cuenta su hogar con horno de microondas que funcione?

- 0. No
- 1. Sí

5.14 ¿Cuenta su hogar con tostador eléctrico de pan que funcione?

- 0. No
- 1. Sí

5.15 ¿Cuenta su hogar con videocassetera que funcione?

- 0. No
- 1. Sí

5.16 ¿Cuenta su hogar con computadora personal?

- 0. No
- 1. Sí

5.17 ¿Qué clase de combustible utiliza para cocinar?

Carbón.....01
Gas.....02
Leña.....03
Electricidad.....04
Otro _____

¿Cuántas veces al día? _____

